

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOCIENCIAS MOLECULARES



**REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA POR
PROCESOS DE UBIQUITINACIÓN Y DEUBIQUITINACIÓN
EN LA INFECCIÓN POR EL VIRUS RESPIRATORIO
SINCITAL HUMANO**

*REGULATION OF THE INNATE IMMUNE RESPONSE BY
UBIQUITINATION AND DEUBIQUITINATION PROCESSES
IN HUMAN RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS INFECTION*

MARÍA MARTÍN VICENTE

MADRID, 2020

Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

**REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA POR PROCESOS DE
UBIQUITINACIÓN Y DEUBIQUITINACIÓN EN LA INFECCIÓN POR EL VIRUS
RESPIRATORIO SINCITAL HUMANO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN BIOLOGÍA
MENCIÓN INTERNACIONAL

Doctorando: María Martín Vicente, Graduada en Biología

Directores: Dr. Isidoro Martínez González y Dr. Salvador Resino García

Tutor: Dr. Iván Ventoso Bande

Unidad de Infección Viral e Inmunidad, Centro Nacional de Microbiología, Instituto
de Salud Carlos III

*“After climbing a great hill,
one only finds that there are many more hills to climb”*

Nelson Mandela.

AGRADECIMIENTOS

Finalmente ha llegado el momento de terminar esta etapa tan larga y fructífera. Hay muchas personas a lo largo de este tiempo que me han acompañado y apoyado hasta conseguir el objetivo final, obtener el título de Doctor. Al final lo que sí que se consigue es terminar creciendo, de una forma u otra.

Dar las gracias al Dr. Isidoro Martínez y al Dr. Salvador Resino por brindarme la oportunidad de unirme a su grupo y poder llevar a cabo este trabajo. Agradecer también al laboratorio de José Antonio Melero, por facilitarme reactivos y equipos, aparte de unas charlas muy agradables, en especial con Blanca.

Amanda y Nines, gracias por vuestra paciencia, cariño y apoyo a lo largo de este tiempo. Por ayudarme con la parte más estadística y de bioinformática del trabajo, explicarme las dudas que tenía de metabolómica o secuenciación. Y gracias sobre todo por estar donde estáis, por poder contar con vosotras para desahogarme y por animarme a seguir adelante. Gracias también a Verónica, por darme ese empujón que tantas veces hace falta para adentrarse en nuevos retos. Alicia, gracias a ti también por esas charlas de poyata, esos consejos de madre y ese espíritu joven, ya echo de menos nuestras conversaciones sobre “tu niño” y “mi niña”.

Al grupo *Junior* del laboratorio, aunque llegasteis más tarde, habéis conseguido poneros muy arriba. Hemos compartido tantas horas juntos que al final no nos queda otra que aguantarnos... Paula, gracias por ser mi confidente, por poder contar contigo y tu opinión, tanto dentro como fuera del laboratorio. Oscar, el paseitos, gracias por sacarme de mis apuros con los datos del ordenador y poner esa vena más infantil (si todavía se puede) a los días. Javi, muchas gracias por ser tan optimista que el resto de las cosas pasen a un segundo plano y por tu perfección que me ha ayudado a mejorar el trabajo con tus “frikismos” de Word. Celia y Ana, aunque habéis sido las últimas en llegar, no considero que haya diferencias, ha sido un placer poder cotillear de todo, desde comidas en instagram, royals de Europa o hacer spoiler de varias series!! Gracias por aguantar mis quejas mañaneras. En definitiva, gracias a todos por hacer posible un grupo tan integrado en el que se pueda hablar de TODO sin tapujos, en el que compartimos momentos buenos y

malos, viajes, cervezas y lo más importante, nos apoyamos en esta trayectoria. Echaré de menos los videos de animalitos de Paula, los desayunos de Óscar, los tantos “y porqués” para todo de Javi, el brilli-brilli de Celia y la calma y tranquilidad que transmite Ana. Os deseo lo mejor en vuestros caminos, aunque estoy segura de que no hace ninguna falta.

Desde que empezamos la universidad has estado a mi lado, hemos tenido muchas, quizás demasiadas, cosas en común, y a pesar de que hayan pasado ya casi 10 años desde entonces, todavía podemos seguir contando la una con la otra aunque el verse no siempre sea posible. Muchas gracias Almu por poder contar contigo para desahogarme con mis audios interminables, porque parece que el “mal de muchos, consuelo de tontos” a nosotras nos funciona a la perfección. Gracias por tu paciencia y optimismo ante las situaciones más difíciles o desfavorables. Nos ha costado llegar hasta el final, sacrificar tiempo con las parejas, amigos e incluso familia para conseguir todo lo que nos hemos ido proponiendo, pero cada vez estamos más cerca de conseguir nuestras últimas metas.

Fuera de Madrid, pero muy dentro mi vida, agradecer en profundidad a todas mis amigas de Riaza, no tengo folios para mencionarlas a todas sin dejarme a ninguna fuera. Desde la infancia me habéis acompañado, comprendido, ayudado en cada una de las etapas y, sobre todo, aguantado mis cambios de humor. Gracias en especial a mis maris, María R y María Y (no te voy a poner trucha) y Luna, por hacer de una noche de desconexión con “me tomo una y a casa”, la fiesta padre con el sobrenombre de “las señoras que huelen a vino”. Gracias por esos momentos de comprensión, risas y lloros a lo largo de todo este tiempo, por guardarme siempre un sitio en los planes por si al final me animo y puedo, sois únicas.

Agradecer a mi tutor, el Dr. Iván Ventoso la gran eficacia en toda la burocracia que incluye este trabajo a lo largo de los diferentes cursos, realmente es de agradecer que haya podido contar con él en cualquier momento.

Hacer una breve mención a todas las personas que hicieron posible mi estancia en Johannesburgo durante la tesis. Fue realmente una experiencia increíble con gente fantástica de alrededor de todo el globo.

Gracias a toda mi familia. La decisión de empezar este trabajo no fue solamente mía. Gracias a mis padres, Isabel y Miguel Ángel, por empujarme y

animarme a empezar esta nueva trayectoria, ya que fue un ahora o nunca. Gracias por apoyar e impulsar todas y cada una de las decisiones que he tomado a lo largo del tiempo. Gracias por la educación que me habéis dado, porque todo en esta vida tiene solución, y porque con ganas, al final todo se arregla. Después de tanto esfuerzo, fines de semana sin vernos, y todos los tupperes que me facilitaban la semana, por fin vuestra hija se doctora.

Por último, pero no menos importante, este camino no lo podría haber terminado sin tu apoyo, Javi. Has sido un pilar esencial para seguir adelante, escuchando todas mis quejas, facilitándome la vida al ocuparte de Kira, acompañándome los fines de semana en casa para no quedarme sola, ayudarme a desconectar cuando yo no era capaz... Gracias por empujarme hacia delante, aunque eso supusiera un hacia atrás para ti. Gracias por saber escucharme incluso cuando no hablo, por tu inmensa paciencia, comprensión, por saber esperar y por llevar tanto tiempo a mi lado.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
ABSTRACT.....	6
RESUMEN.....	7
INTRODUCCIÓN	8
1. Virus Respiratorio Sincitial Humano	8
1.1. Clasificación taxonómica	8
1.2. Características de la infección.....	9
1.2.1. Epidemiología y transmisión.....	9
1.2.2. Aspectos clínicos.....	9
1.3. Diagnóstico y tratamiento	11
1.4. Biología molecular del VRSH	13
1.4.1. Estructura y genoma	13
1.4.2. Proteínas virales	14
1.4.3. Ciclo de replicación	17
2. Respuesta inmune frente al VRSH.....	19
2.1. Respuesta inmune innata temprana	19
2.1.1. Receptores RLR (RIG-I Like Receptors)	21
2.1.2. Receptores TLR (Toll Like Receptors).....	22
2.1.3. Receptores NLR (NOD Like Receptors)	23
2.2. Respuesta inmune adaptativa	23
2.3. Modulación de la respuesta inmune por proteínas del VRSH.....	24
3. Regulación de la respuesta inmune innata por procesos de ubiquitinación y deubiquitinación	25
3.1. Ubiquitinación: mecanismo enzimático	26
3.2. La ubiquitinación es un proceso reversible	27
3.3. Regulación de RIG-I mediante procesos de ubiquitinación y deubiquitinación ..	28
3.4. A20 (TNFAIP3).....	30
3.4.1. Regulación de la respuesta inmune innata por A20.....	32
OBJETIVOS.....	34
MATERIAL Y MÉTODOS.....	35
1. Materiales	35
1.1. Material Biológico	35
1.1.1. Líneas celulares	35
1.1.2. Virus.....	35
1.1.3. Bacterias	35
1.1.4. Plásmidos	35

1.1.5. Medios de cultivo.....	36
1.1.5.1. Medios para el cultivo de células eucariotas	36
1.1.5.2. Medios para el crecimiento de bacterias	37
1.2. Reactivos	37
1.2.1. RNAs de interferencia pequeños (siRNA)	37
1.2.2. Sondas q-PCR	38
1.2.3. SYBR-Green	38
1.2.4. Oligonucleótidos empleados para secuenciación	39
1.2.5. Anticuerpos	40
1.2.6. Tampones y soluciones de trabajo	40
1.2.7. Otros reactivos	41
2. Métodos	42
2.1. Manipulación de células y virus	42
2.1.1. Cultivos celulares	42
2.1.1.1. Mantenimiento y conservación	42
2.1.1.2. Procesamiento de muestras celulares	42
2.1.2. Virus.....	43
2.1.2.1. Infección con el VRSH.....	43
2.1.2.2. Purificación del VRSH	43
2.1.2.3. Titulación del VRSH.....	44
2.2. Manipulación de bacterias.....	45
2.2.1. Generación de bacterias competentes	45
2.2.2. Transformación, conservación y cultivo de bacterias competentes	45
2.2.3. Extracción de plásmidos de bacterias	46
2.2.4. Generación del plásmido control	46
2.3. Manipulación de RNA.....	46
2.3.1. Extracción de RNA de células eucariotas.....	46
2.3.2. Reacción de la transcriptasa inversa	47
2.4. Manipulación de DNA.....	47
2.4.1. PCR a tiempo real (q-PCR).....	47
2.4.2. Secuenciación de DNA	48
2.5. Manipulación de proteínas	48
2.5.1. Extracción de proteínas totales	48
2.5.2. Cuantificación de proteínas	48
2.5.3. Análisis de las proteínas mediante SDS-PAGE y Western Blot.....	49
2.6. Diseño de siRNAs	49
2.7. Ensayos de silenciamiento	50

2.8.	Ensayos de sobreexpresión	51
2.9.	Generación de células “ <i>knockout</i> ” para A20	51
2.10.	Ensayos de viabilidad celular	52
2.11.	Ensayos de apoptosis	52
2.12.	Preparación de librerías de mRNA-seq y secuenciación	53
2.13.	Análisis de datos	54
2.14.	Anotación funcional de los genes seleccionados.....	54
2.15.	Análisis estadístico	55
RESULTADOS.....		56
1.	Respuesta celular a la infección por el VRSH: Señalización vía RIG-I	56
1.1.	La activación de RIG-I es esencial para desencadenar la respuesta inmune innata en células infectadas por el VRSH	56
1.2.	Los silenciamientos de TRAF3 o TRAF6, dos adaptadores de la ruta de RIG-I, también reducen la respuesta inmune celular a la infección por el VRSH.....	57
1.3.	Regulación de RIG-I por procesos de ubiquitinación y deubiquitinación.....	59
2.	Papel de A20 en la infección por el VRSH	61
2.1.	La infección por el VRSH aumenta los niveles de expresión de A20	61
2.2.	El silenciamiento de A20, TAX1BP1 o ABIN1 incrementa la respuesta inmune innata y disminuye la producción de virus.....	62
2.3.	La producción del VRSH disminuye en células “ <i>knockout</i> ” para A20 mientras que la respuesta antiviral e inflamatoria aumenta en estas células.....	64
2.4.	A20 tiene un efecto anti-apoptótico en células infectadas con el VRSH	68
2.5.	Sobreexpresión de A20 en células A549 infectadas por VRSH	71
2.5.1.	La sobreexpresión de A20 o TAX1BP1 de forma independiente no afecta a la respuesta inmune innata ni a la replicación del virus.....	72
2.5.2.	La expresión conjunta de A20, TAX1BP1 y ABIN1 tampoco modifica la respuesta inmune innata ni la replicación del VRSH	73
3.	Uso de siRNAs como inhibidores de la replicación del VRSH y moduladores de la respuesta inmune innata	74
3.1.	Alineamiento del genoma del VRSH con los genes implicados en la señalización intracelular y selección de los siRNAs biespecíficos	75
3.2.	Los siRNAs dirigidos frente a mRNAs del VRSH inhiben la producción de virus77	
3.3.	El silenciamiento de la N, pero no el de la F, produce una inhibición generalizada de la expresión del RNA y proteínas virales.....	79
3.4.	Los siRNAs frente a la N reducen drásticamente la respuesta inmune innata celular mientras que los siRNAs frente a la F tienen un efecto moderado.....	83
DISCUSIÓN.....		86
1.	Papel de RIG-I en la respuesta inmune celular a la infección por el VRSH	87
1.1.	Regulación de RIG-I por ubiquitininasas y deubiquitininasas	88

2. Modulación de la respuesta inmune y la replicación del VRSH por A20	90
3. Empleo de siRNAs como moléculas para modular la respuesta inmune innata y la replicación viral	93
CONCLUSIONS.....	98
CONCLUSIONES	99
BIBLIOGRAFÍA.....	100
ANEXO I	115
ANEXO II	117
AII.1. PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS	117
AII.2. OTRAS PUBLICACIONES	117

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ABIN1	De sus siglas en inglés “A20-Binding Inhibitor of NF-κB 1”
ACTB	Actina-β
AMPK	De sus siglas en inglés “AMP-activated Protein Kinase”
AP-1	De sus siglas en inglés “Activating Protein-1”
BCA	Ensayo de ácido bicinconínico
BSA	De sus siglas en inglés “Bovine Serum Albumin”
CARDs	De sus siglas en inglés “Caspase Activation and Recruitment Domains”
CCL5 (RANTES)	De sus siglas en inglés “C-C motif chemokine ligand 5”
cDNA	DNA complementario
CMV	Citomegalovirus
COPD	De sus siglas en inglés “Chronic Obstructive Pulmonary Disease”
CTD	De sus siglas en inglés “C-Terminal Domain”
CX3CR1	De sus siglas en inglés “C-X3-C motif Chemokine Receptor 1”
CXCL10 (IP10)	De sus siglas en inglés “C-X-C motif chemokine Ligand 10”
CXCL8 (IL8)	De sus siglas en inglés “C-X-C motif chemokine Ligand 8”
CYLD	De sus siglas en inglés “Cylindromatosis”
DDX58 (RIG-I)	De sus siglas en inglés “DExD/Hbox helicase 58”
DMEM	De sus siglas en inglés “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium”
DTT	Dithiothreitol
DUBs	Deubiquitinases
E1	Enzima activadora de ubiquitina

E2	Enzima conjugadora de ubiquitina
E3	Enzima ligasa de ubiquitina
F	Proteína de fusión del VRSH
FC	De sus siglas en inglés “Fold Change”
FLong	siRNA frente a la proteína F de la cepa Long del VRSH
G	Glicoproteína de unión al receptor del VRSH
Gs	Glicoproteína de unión al receptor del VRSH soluble
GE	De sus siglas en inglés “Gene End”
GS	De sus siglas en inglés “Gene Start”
HECT	De sus siglas en inglés “Homologous to E6-associated protein C-terminus”
hpi	Horas post-infección
IF	Inmunofluorescencia directa
IFN	Interferón
IFNAR	De sus siglas en inglés “IFN- α/β Receptor”
IKKBK (IKK)	De sus siglas en inglés “Inhibitor of Nuclear Factor Kappa B Kinase Subunit Beta”
IKBK (NEMO)	De sus siglas en inglés “Inhibitor of Nuclear Factor Kappa B Kinase Subunit Gamma”
IL	Interleuquina
IRF	De sus siglas en inglés “Interferon Regulator Factor”
ISGs	De sus siglas en inglés “Interferon Stimulated Genes”
ITCH	Itchy E3 Ubiquitin Protein
JAMM	Dominio JAB1/MPN/Mov34
K	Lisina

Kb	Kilobase
KO	De sus siglas en inglés “Knockout”
L	RNA polimerasa dependiente de RNA del VRSH
LGP2	De sus siglas en inglés “Laboratory of Genetics and Physiology 2”
LRTI	De sus siglas en inglés “Lower Respiratory Tract Infection”
M	Proteína de la matriz del VRSH
M2-I	Proteína viral M2-I o 22K del VRSH
M2-II	Proteína viral M2-II del VRSH
MAP3K14 (NIK)	De sus siglas en inglés “Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 14”
MAPK	De sus siglas en inglés “Mitogen-Activated Protein Kinase”
MAVS	De sus siglas en inglés “Mitochondrial Antiviral-Signaling Protein”
MDA5	De sus siglas en inglés “Melanoma Differentiation-Associated protein 5”
MJD	De sus siglas en inglés “Machado-Josephin Domain”
MOI	De sus siglas en inglés “Multiplicity of Infection”
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
N	Nucleoproteína del VRSH
NF-κB	De sus siglas en inglés “Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells”
NLR	De sus siglas en inglés “NOD-Like Receptor”
NS1	Proteína viral no estructural 1 del VRSH
NS2	Proteína viral no estructural 2 del VRSH
nt	Nucleótido

ORF	De sus siglas en inglés “Open Reading Frame”
OTU	De sus siglas en inglés “Ovarian Tumor”
P	Fosfoproteína del VRSH
PAMPs	De sus siglas en inglés “Pathogen-Associated Molecular Patterns”
pb	Pares de bases
PRR	De sus siglas en inglés “Pattern Recognition Receptor”
qPCR	PCR cuantitativa
RADT	De sus siglas en inglés “Rapid Antigen Detection Test”
RBR	De sus siglas en inglés “RING-in-between-RING”
RIG-I	De sus siglas en inglés “Retinoic acid-Inducible Gene I”
RIGI-N	siRNA específico frente a RIG-I y la nucleoproteína del VRSH
RING	De sus siglas en inglés “Really Interesting New Gene”
RIP2	De sus siglas en inglés “Receptor Interacting Serina/Threonina Kinase 2”
RLR	De sus siglas en inglés “RIG-I-Like Receptor”
RNase	Ribonucleasa
RNAv	RNA viral
RNF	De sus siglas en inglés “RING Finger protein”
RNP	Ribonucleoproteína
SFB	Suero Fetal Bovino
SH	Proteína pequeña hidrofóbica del VRSH
SR	De sus siglas en inglés “Survival Rate”
STAT	De sus siglas en inglés “Signal Transducer and Activator of Transcription”

TALENs	De sus siglas en inglés “Transcription Activator-Like Effector Nuclease”
TAX1BP1	De sus siglas en inglés “Tax1-Binding Protein 1”
TBK1	De sus siglas en inglés “TANK Binding Kinase1”
TBS	De sus siglas en inglés “Tris Buffered Saline”
TLR	De sus siglas en inglés “Toll-Like Receptor”
T _m	Temperatura de fusión
TNF- α	De sus siglas en inglés “Tumor Necrosis Factor Alpha”
TNFAIP3 (A20)	De sus siglas en inglés “TNF- α Induced Protein 3”
TNFR1	De sus siglas en inglés “TNF Receptor 1”
TRAF	De sus siglas en inglés “TNF Receptor Associated Factor”
TRIM25	De sus siglas en inglés “Tripartite Motif-containing protein 25”
Ub	Ubiquitina
USP	De sus siglas en inglés “Ubiquitin-Specific Proteases”
VRSH	Virus Respiratorio Sincitial Humano

ABSTRACT & RESUMEN

ABSTRACT

The Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV), for which no vaccine or effective treatment is available, causes severe lower respiratory tract infections, such as bronchiolitis and pneumonia, in infants, the elderly, and immunocompromised adults. These pathologies are characterized by an intense inflammatory process that contributes to increased disease. Our goal is to understand how this process is regulated to avoid its pathological effects. Following virus infections, intracellular signaling pathways leading to the induction of proinflammatory genes are activated. Those pathways are tightly regulated by ubiquitination/deubiquitination of several proteins of the route. In this thesis, we have investigated how the innate immune response against HRSV is induced and regulated by ubiquitination/deubiquitination processes. By using specific siRNAs, it has been shown that the downregulation of the RIG-I receptor reduced the immune response drastically in HRSV infected cells. In contrast, downregulation of the deubiquitinase TNFAIP1/A20, a master regulator of inflammation, by siRNAs or gene knockout, showed increased inflammatory/antiviral response and reduced virus production. Similar results were obtained when the expression of A20-interacting proteins, such as TAX1BP1 and ABIN1, was silenced. Additionally, downregulation of A20, TAX1BP1, and ABIN1 increased cell apoptosis in HRSV-infected cells.

To identifying new molecules to treat HRSV infection, siRNAs to the viral fusion (F) or nucleoprotein (N) were designed. These siRNAs reduced virus replication to a similar extent. However, while targeting HRSV N reduced the cellular immune response drastically, HRSV F silencing had only a moderate effect. Additionally, bispecific siRNAs targeting viral and cellular immune genes at the same time were also designed that reduced both virus replication and the immune response.

These results show that HRSV replication and the associated early innate immune response can be modulated by targeting distinct viral and/or cellular genes with siRNAs.

RESUMEN

El Virus Respiratorio Sincitial Humano (VRSH), para el cual no existe una vacuna ni tratamiento específico, causa infecciones graves del tracto respiratorio inferior, tales como bronquiolitis y neumonía, en niños pequeños, ancianos y adultos inmunocomprometidos. Estas patologías se caracterizan por un intenso proceso inflamatorio que contribuye a agravar la enfermedad. Nuestro objetivo es entender cómo se regula este proceso para evitar su efecto patológico. Tras una infección viral, se activan rutas de señalización intracelular que dan lugar a la expresión de genes proinflamatorios. Estas rutas están fuertemente reguladas mediante ubiquitinación/deubiquitinación de varias proteínas que participan en ellas. En esta tesis, hemos investigado cómo se induce la respuesta inmune frente al VRSH y cómo se regula por procesos de ubiquitinación/deubiquitinación. Mediante el uso de siRNAs específicos, se ha demostrado que el silenciamiento del receptor RIG-I reduce de forma drástica la respuesta inmune en las células infectadas por el VRSH. Por el contrario, la inhibición de la expresión de la deubiquitinasa TNFAIP3/A20 (una proteína fundamental en la regulación de la inflamación) mediante siRNAs o en células “*knockout*”, dio lugar a un aumento de la respuesta inflamatoria/antiviral y un descenso de la producción de virus. Resultados similares se obtuvieron cuando se inhibió la expresión de proteínas que interaccionan con A20, tales como TAX1BP1 y ABIN1. Además, la inhibición de A20, TAX1BP1 y ABIN1 aumentó los niveles de apoptosis en las células infectadas por el VRSH.

Con el objetivo de identificar nuevas moléculas para tratar las infecciones por el VRSH, se diseñaron siRNAs frente a las proteínas virales F o N. Ambos siRNAs redujeron la replicación viral de forma similar. Sin embargo, mientras que el silenciamiento de N redujo de forma drástica la respuesta inmune celular, el silenciamiento de F tuvo solo un efecto moderado. Además, también se diseñaron siRNAs biespecíficos dirigidos frente a genes virales y celulares al mismo tiempo, los cuales redujeron tanto la replicación del virus como la respuesta inmune.

Estos resultados muestran que la replicación del VRSH y la respuesta inmune innata asociada se pueden modular mediante siRNAs frente a distintos genes virales y/o celulares.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Virus Respiratorio Sincitial Humano

El Virus Respiratorio Sincitial Humano (VRSH) se aisló por primera vez en 1955 en una colonia de chimpancés que presentaron síntomas de un resfriado común (estornudos, tos y secreción nasal) en Baltimore, Estados Unidos (Blount et al., 1956). Posteriormente, el mismo virus fue aislado en niños con infección de las vías respiratorias y en la actualidad es reconocido como el principal causante de las infecciones del tracto respiratorio inferior (LRTI) en pacientes pediátricos (Chanock and Finberg, 1957, Chanock et al., 1957).

1.1. Clasificación taxonómica

El VRSH pertenece a la familia *Pneumoviridae*, dentro del orden *Mononegavirales* (Figura 1) (Amarasinghe et al., 2019, Collins, 2013). La familia *Pneumoviridae* engloba los géneros *Metapneumovirus* (especies *Metapneumovirus aviar* y *Metapneumovirus humano*) y *Orthopneumovirus*, en el cual se incluyen las especies del *Virus Respiratorio Sincitial Bovino* (VRSB), *Virus Respiratorio Sincitial Humano* (VRSH) y *Virus de la Pneumonía Murina* (VPM) (Figura 1) (Amarasinghe et

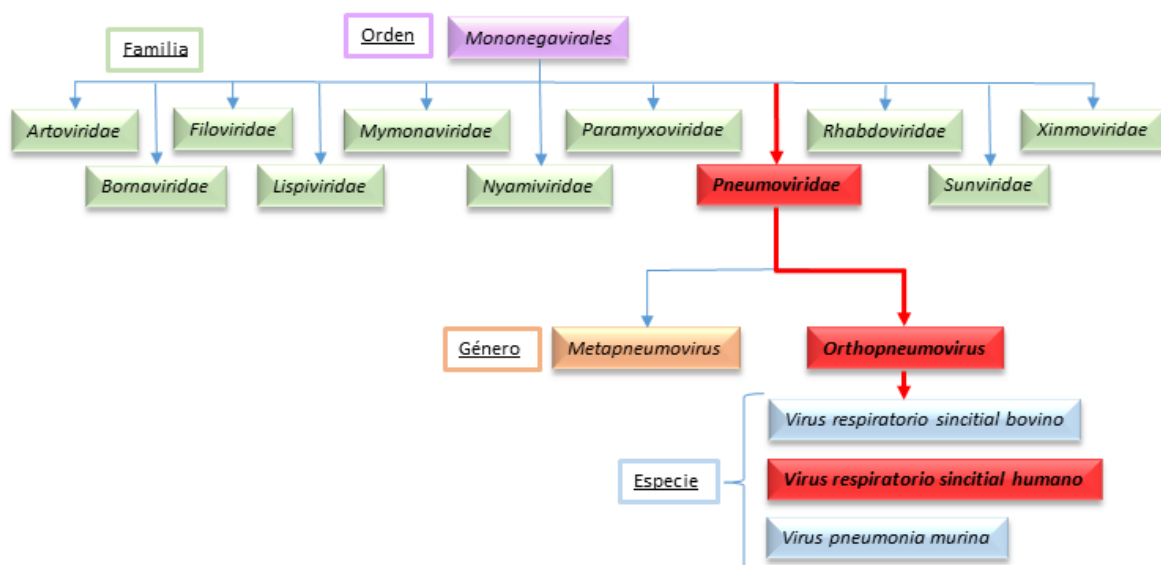


Figura 1. Esquema de la clasificación taxonómica del Virus Respiratorio Sincitial Humano. En rojo se indica la familia, género y especie al que pertenece el VRSH dentro del orden de los *Mononegavirales*.

al., 2019).

1.2. Características de la infección

1.2.1. Epidemiología y transmisión

La infección por el VRSH afecta principalmente a la población pediátrica, se estima que casi la totalidad de niños se han infectado por este virus a la edad de dos años. La población adulta también es susceptible a la infección por el VRSH, aunque los síntomas son más severos en ancianos y grupos de riesgo como pacientes inmunodeprimidos, con enfermedades cardíacas congénitas o con enfermedades pulmonares crónicas (Falsey et al., 2005, Mazur et al., 2018, Walsh, 2017, Sundaram et al., 2014, Widmer et al., 2014). Las reinfecciones por el VRSH continúan a lo largo de la vida, aunque la severidad de la infección va disminuyendo con el paso de los años (Hall et al., 2009, Walsh, 2017). En 2015 se estimaron en torno a 33.1 millones de casos de infecciones del tracto respiratorio inferior causadas por el VRSH en niños menores de cinco años en todo el mundo, de las cuales alrededor de 3.2 millones requirieron hospitalización, y 60.000 fallecieron. Estos datos varían entre los diferentes países, de modo que los países en desarrollo presentan unas tasas mayores que los países desarrollados (Shi et al., 2017, Lozano et al., 2012).

El VRSH presenta una actividad estacional que depende, tanto de la localización geográfica, como del clima. En climas templados, las epidemias anuales suceden durante los meses de otoño e invierno (Bloom-Feshbach et al., 2013, Hogan et al., 2016). En las zonas tropicales, la circulación del VRSH es más variable, siendo más común durante la época de lluvias, pero circulando a lo largo de todo el año (Bloom-Feshbach et al., 2013).

El VRSH es altamente contagioso y su propagación sucede a través del aire, o mediante el contacto directo con secreciones de las vías respiratorias o conjuntivas de individuos infectados (Collins, 2013, Piedimonte and Perez, 2014).

1.2.2. Aspectos clínicos

La infección por el VRSH presenta un periodo de incubación que oscila entre los 4 y 6 días, tras los cuales aparece congestión nasal con secreción de mocos y

fiebre, como signos más frecuentes de la infección. Posteriormente, aparece tos, taquipnea, inflamación de las mucosas de las vías respiratorias y sibilancias, siendo este último un síntoma característico de la bronquiolitis causada por el VRSH. En pacientes con infección severa puede darse letargia, otitis media, inapetencia e incluso episodios de apnea (Walsh, 2017, Piedimonte and Perez, 2014).

La bronquiolitis causada por el VRSH se caracteriza por una inflamación de los bronquios y bronquiolos del paciente infectado. Esta inflamación, junto a la mucosidad, produce la obstrucción del lumen de las vías respiratorias, reduciendo el flujo de aire a través de ellas. En el caso de la población infantil, las vías respiratorias son más estrechas (250 μm en adultos frente a 120 μm en bebés de 2 a 4 meses), por lo que se obstruyen más fácilmente incrementando la severidad de la patología (Pickles and DeVincenzo, 2015).

Aparte del tamaño de las vías respiratorias, la gravedad de la infección por el VRSH depende de una serie de factores de riesgo: (i) Relacionados con el desarrollo del recién nacido: prematuridad (Gouyon et al., 2013), exposición al tabaco durante y después del embarazo (Semple et al., 2011, Bradley et al., 2005, Koehoorn et al., 2008), edad de la infección (Nascimento et al., 2010), género masculino (Semple et al., 2011, Koehoorn et al., 2008), lactancia materna (Miller et al., 2011) o asma materno durante el embarazo (Carroll et al., 2007). (ii) Comorbilidades en adultos: enfermedad pulmonar crónica, enfermedades congénitas cardíacas (Ochoa Sangrador et al., 2010), pacientes inmunocomprometidos, cáncer, fibrosis quística (Manzoni et al., 2017, Billings et al., 2002), co-infecciones virales (García García et al., 2001), dermatitis atópica (Al-Shehri et al., 2005) o síndrome de Down (Manzoni et al., 2017, Bloemers et al., 2007). (iii) Otros factores: bajo estatus socioeconómico (Koehoorn et al., 2008), la etnia (Grimwood et al., 2008, Meissner, 2003, Leader and Kohlase, 2003), la estacionalidad al nacimiento (Grimwood et al., 2008), contaminación ambiental (Karr et al., 2007), o factores genéticos (Manzoni et al., 2017, Alvarez et al., 2013).

Los costes que implican las hospitalizaciones de pacientes infectados por el VRSH son muy altos a nivel global. Países como Canadá, Estados Unidos o Australia han informado de un impacto económico importante relacionado con las hospitalizaciones por el VRSH (Langley et al., 1997, Paramore et al., 2004,

Ranmuthugala et al., 2011). En el caso de España, un estudio realizado en 2015 por Gil-Prieto et al (Gil-Prieto et al., 2015), también mostró un gran impacto económico con un gasto anual de 47 millones de euros en hospitalizaciones de niños menores de 5 años con infección por VRSH.

1.3. Diagnóstico y tratamiento

Un correcto diagnóstico de la infección es necesario para poder proporcionar un adecuado y temprano tratamiento en los grupos de riesgo, controlar la dispersión de la enfermedad evitando una propagación nosocomial, y reducir el uso innecesario de antibióticos o la duración de los mismos (Alvarez et al., 2009, DeVincenzo et al., 2010). En el diagnóstico de la infección por el VRSH, destacan de forma rutinaria los test rápidos de detección de antígenos (RADTs) como la inmunofluorescencia directa (IF), y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Principi and Esposito, 2009, Leland and Ginocchio, 2007, Aslanzadeh et al., 2008). Esta última es la más empleada, ya que presenta mayor sensibilidad, una detección más rápida de la presencia del virus, y puede realizarse a partir de muestras de hisopos y lavados nasales y aspirados nasofaríngeos, tanto de pacientes pediátricos como de adultos (Liao et al., 2009, Leland and Ginocchio, 2007).

A pesar de los esfuerzos de los últimos años, actualmente no se ha conseguido desarrollar ningún tratamiento eficaz o vacuna frente al VRSH. Tanto en la población pediátrica, como en la adulta, se emplean cuidados de soporte tales como la eliminación mecánica de secreciones, administración de oxígeno, hidratación oral o intravenosa y en los casos más graves, ventilación mecánica (Vincent et al., 2017). Estas prácticas se complementan con el empleo de dexametasona (Kuyucu et al., 2004), ribavirina (aprobado en 1986) (Chu and Englund, 2013) o roflumilast (Calverley et al., 2009).

El único tratamiento específico actual frente a las infecciones por el VRSH es la inmunización pasiva con palivizumab (MEDI-493, Synagis, MedImmune Vaccines, Inc., Gaithersburg, MD, USA) (Johnson et al., 1997, Group, 1998), aunque solamente se emplea como tratamiento profiláctico en pacientes de alto riesgo (Chu and Englund, 2013). Palivizumab es un anticuerpo monoclonal frente a la proteína F (Beeler and van Wyke Coelingh, 1989), capaz de inhibir la fusión de las membranas viral y celular (Chu and Englund, 2013). La profilaxis con palivizumab reduce hasta

un 55% el número de hospitalizaciones por VRSH en niños, aunque al compararlos con un grupo control, no se encontraron diferencias en el número de admisiones a las unidades de cuidados intensivos o en la necesidad de ventilación mecánica (Group, 1998). El inconveniente principal de palivizumab es su baja efectividad en los niños ya infectados, aparte de su alto coste y su administración de forma intravenosa o intramuscular (Chu and Englund, 2013).

Aparte del palivizumab, actualmente se están desarrollando nuevas aproximaciones terapéuticas frente a la infección por el VRSH, basadas en: nuevos anticuerpos (Carbonell-Estrany et al., 2010, Ramilo and OSJ, 2012, Feltes et al., 2011, Fernández et al., 2010), inhibidores de la fusión (Bonfanti and Roymans, 2009, Olszewska et al., 2011), inhibidores de la polimerasa (Tiong-Yip et al., 2012), benzodiazepinas frente a la nucleocápsida del virus (Chapman et al., 2007, Chu and Englund, 2013) o RNAs de interferencia pequeños (siRNA) (DeVincenzo, 2008, Zamora et al., 2011).

El desarrollo de una vacuna frente al VRSH se ha visto dificultado por la inmadurez del sistema inmune de los pacientes pediátricos, la capacidad del VRSH de evadir la respuesta inmune innata, y la inducción de una inmunidad adaptativa de corta duración que no previene la reinfección por este virus (Esposito et al., 2016). Además, el fracaso de un estudio llevado a cabo en 1967, en el que se empleó una vacuna con el virus inactivado con formalina, hace que los ensayos clínicos actuales sean mucho más estrictos. Durante ese estudio, los niños vacunados desarrollaron una mayor gravedad de los síntomas ante una infección natural posterior, en comparación con el grupo control, e incluso se produjeron dos muertes en los pacientes vacunados (Kapikian et al., 1969, Kim et al., 1969).

Las investigaciones en el campo de las vacunas frente al VRSH se están centrando en nanopartículas (Novavax) y vacunas desarrolladas a partir de subunidades del virus para la población anciana y las embarazadas; y vacunas basadas en vectores recombinantes y subunidades del virus para la población pediátrica (PATH, 2019, Jares Baglivo and Polack, 2019). Entre las diferentes aproximaciones, las vacunas más prometedoras están basadas en la proteína F del VRSH.

1.4. Biología molecular del VRSH

1.4.1. Estructura y genoma

La morfología de los viriones del VRSH es heterogénea, encontrándose principalmente formas redondeadas (entre 100 a 350 nm de diámetro) o filamentosas (de 60 a 200 nm de diámetro y hasta 10 µm de longitud). En la envuelta del virión se disponen 3 glicoproteínas transmembrana: la glicoproteína G (G) de unión al receptor celular; la proteína de fusión (F), y la proteína pequeña hidrofóbica (SH). Debajo de esta membrana, la proteína de la matriz (M) forma una capa que encierra la nucleocápsida, formada por el RNA viral (RNA_v) y 4 proteínas virales: la nucleoproteína (N), la fosfoproteína (P), la proteína M2-I/II y la polimerasa (L) (Figura 2) (Collins, 2013, Collins et al., 2013, Melero, 2017).

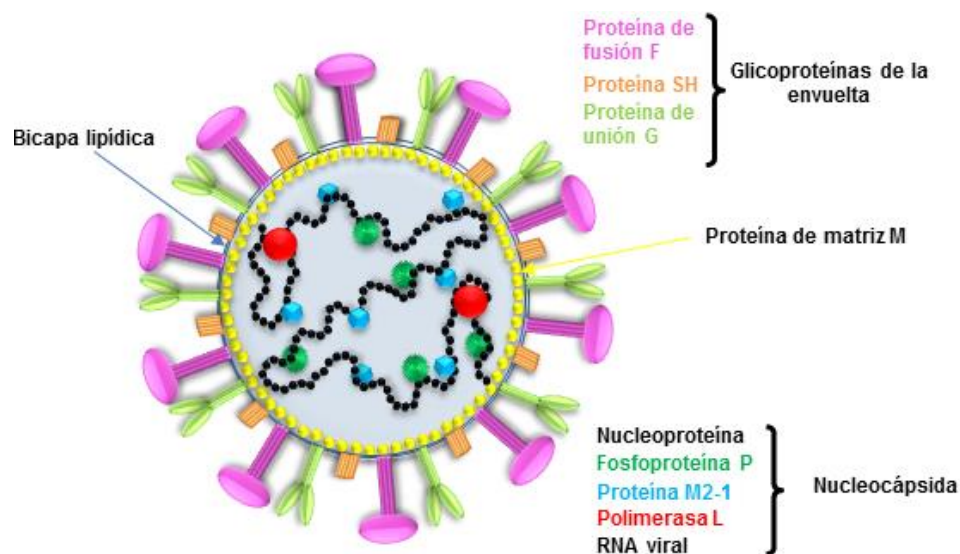


Figura 2. Representación de la partícula del VRSH. Se indica la posición de las diferentes proteínas que conforman la partícula viral.

El VRSH presenta un genoma compuesto por una sola molécula de RNA no segmentado, cadena simple de polaridad negativa, y de aproximadamente 15 kilobases (Kb) de longitud. Este genoma se dispone de forma helicoidal asociado a la nucleoproteína del virus formando una ribonucleoproteína resistente a las RNasas (Collins, 2013). El genoma de la cepa Long empleada en esta memoria tiene un tamaño de 15.226 nucleótidos (nt), pudiendo variar este número ligeramente entre

las diferentes cepas del virus. Contiene 10 genes que codifican para un total de 11 proteínas debido a que el gen M2 presenta dos fases de lectura abiertas (ORF) accesibles a los ribosomas, que se traducen en las proteínas M2-I y M2-II (Collins et al., 1986, Gould and Easton, 2007). El genoma carece de la estructura CAP en el extremo 5' y de la cola de poli-A en el extremo 3' (Collins et al., 2013). Presenta una región “*leader*” de 44 nucleótidos (nt) en el extremo 3' del genoma que precede al gen NS1, que es donde se encuentra el promotor para la transcripción de los genes. En el extremo 5' se encuentra la región “*tráiler*” de 155 nt (Figura 3) (Bukreyev et al., 2000, Harmon and Wertz, 2002).

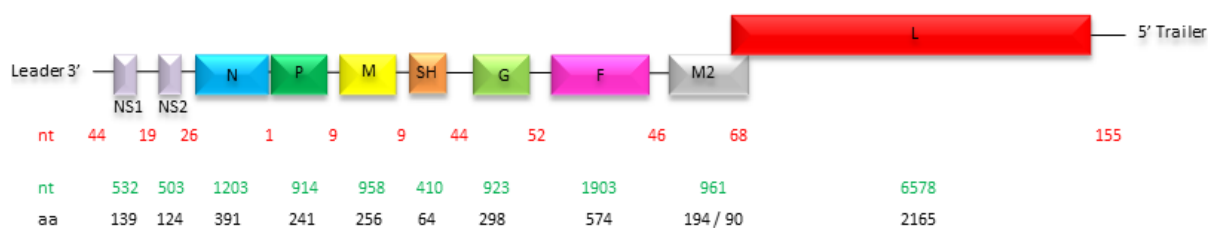


Figura 3. Esquema del genoma del VRSH. Los números en rojo indican el tamaño en nucleótidos de las regiones intergénicas, en verde el tamaño de cada gen y en negro el número de aminoácidos de la proteína correspondiente.

Cada uno de los genes del VRSH presenta una secuencia altamente conservada de 9 nt denominada “*Gene Start*” (GS) en su extremo 3' y una secuencia ligeramente conservada de 12 a 14 nt denominada “*Gene End*” (GE) en su extremo 5' (Harmon and Wertz, 2002, Bukreyev et al., 2000). La secuencia GS dirige el inicio de la síntesis del mRNA de cada uno de los genes y la adición del CAP (Bukreyev et al., 2000, Harmon and Wertz, 2002, Wang et al., 2007, Muniyandi et al., 2018). Por otro lado, la secuencia GE actúa como secuencia señal de terminación de la transcripción y para la adición de la cola de poli-A al extremo 3' del mRNA (Kuo et al., 1996, Fearn and Collins, 1999). Los últimos dos genes del VRSH, M2 y L se encuentran solapados 68 nt, en concreto la secuencia GS de la L se sitúa 68 nt por delante de la secuencia GE del gen M2 (Figura 3) (Collins et al., 1987).

1.4.2. Proteínas virales

- Proteínas no estructurales NS1 y NS2: Son dos proteínas de pequeño tamaño, 139 y 124 aminoácidos respectivamente, que no forman parte del

virión maduro (Collins et al., 2013, Spann et al., 2005). Inhiben la inducción de interferón α/β (IFN α/β) (Spann et al., 2004) y su señalización (Ren et al., 2011) en las células infectadas. También inhiben la apoptosis de estas células, favoreciendo la supervivencia celular y la producción de virus (Bitko et al., 2007). Aunque tienen actividad por separado, se ha demostrado que son más eficientes cuando actúan conjuntamente (Spann et al., 2005).

- Nucleoproteína (N): Formada por 391 aminoácidos, se une tanto al RNA genómico como al antígeno del VRSH, formando una ribonucleoproteína helicoidal para evitar la degradación del RNA por las RNasas (Collins et al., 2013, Bakker et al., 2013).
- Fosfoproteína (P): Tiene un tamaño de 241 aminoácidos y actúa como co-factor de la RNA polimerasa viral. Interacciona con la nucleoproteína y la proteína M2-I para formar la nucleocápsida del virus y favorece la unión de la nucleoproteína a los RNA virales de nueva síntesis (Melero, 2017, Collins et al., 2013).
- Proteína de la Matriz (M): Formada por 256 aminoácidos, se encuentra situada en la cara interna de la membrana viral. Juega un papel clave en coordinar el ensamblaje y empaquetamiento del virus en la membrana plasmática, promoviendo la interacción de las glicoproteínas virales de la envuelta y la nucleocápsida (Money et al., 2009).
- Proteína pequeña hidrofóbica (SH): Es una glicoproteína transmembrana de tipo II de 64 aminoácidos de tamaño (Chen et al., 2000). Su función no se conoce con claridad aunque se ha visto que está involucrada en prevenir la apoptosis de las células infectadas (Lin et al., 2003, Fuentes et al., 2007) y puede actuar como viroporina, modificando la permeabilidad de la membrana (Araujo et al., 2016, Gan et al., 2012).
- Glicoproteína de unión al receptor (G): Es una glicoproteína que puede encontrarse como proteína transmembrana de tipo II (G) (Melero, 2017), o en forma soluble (Gs) que se secreta al exterior celular. La forma transmembrana se encuentra anclada a la envuelta de la partícula viral siendo la encargada de la unión entre el virión y la célula hospedadora a través del receptor celular de la fractalkina (CX3CR1) (Johnson et al., 2015, Chirkova et al., 2015). La forma soluble constituye alrededor del 20% del total

de la proteína G y podría actuar como señuelo para atrapar anticuerpos neutralizantes dirigidos contra la proteína G del VRSH y minimizar los efectos antivirales de la respuesta inmune humoral (Hendricks et al., 1988).

- Proteína de Fusión (F): Es una glicoproteína transmembrana de tipo I, de 574 aminoácidos de tamaño. Su función principal es la de fusionar la envuelta de la partícula viral con la membrana plasmática de la célula hospedadora (Melero, 2017). En estadios tardíos de la infección, la proteína F expresada en la superficie de las células infectadas puede fusionarse con células vecinas formando los sincitios multinucleares característicos de la infección por VRSH (Melero, 2017). La proteína F está considerada como la principal diana para el desarrollo de fármacos antivirales, y junto a la proteína G, antígeno diana de anticuerpos neutralizantes inducidos por la infección (Melero, 2017, McLellan et al., 2013).
- Proteína M2-I o 22K: Codificada por el gen M2 a partir de la primera fase de lectura abierta (Gould and Easton, 2007), tiene un tamaño de 194 aminoácidos y actúa como un factor esencial de la transcripción evitando su terminación prematura (Collins et al., 1995, Collins et al., 1996). Forma homotetrámeros altamente estables que se unen al RNA viral y a la fosfoproteína del virus (Richard et al., 2018, Muniyandi et al., 2018). También está involucrada en el ensamblaje de la partícula viral interactuando con la M y la nucleocápsida (Kiss et al., 2014, Muniyandi et al., 2018).
- Proteína M2-II: Proteína no estructural de 90 aminoácidos que es codificada a partir de la segunda fase de lectura del gen M2 (Gould and Easton, 2007). Es sintetizada a bajos niveles en las células infectadas y está involucrada en la regulación del cambio entre transcripción y replicación del RNA (Bermingham and Collins, 1999, Melero, 2017).
- RNA polimerasa RNA dependiente (L): Es la proteína de mayor tamaño del VRSH con 2165 aminoácidos (Melero, 2017). La conformación de la polimerasa depende de su interacción con la fosfoproteína viral con la cual forma el complejo de la RNA polimerasa para unirse a la proteína N y dirigir la síntesis del mRNA, del RNA de polaridad positiva, y del RNAv (Gilman et al., 2019).

1.4.3. Ciclo de replicación

El contacto entre la partícula viral y la célula hospedadora sucede a través de la unión de la proteína G del virus con el receptor CX3CR1 de la fractalkina en las células epiteliales pulmonares (Johnson et al., 2015, Chirkova et al., 2015). Al mismo tiempo, la proteína F también favorece la unión de ambas membranas a través de la interacción con la nucleolina de la superficie celular (Collins, 2013). Durante la unión, la proteína F, en su estado inicial de pre-fusión, sufre un cambio conformacional al interaccionar con los receptores de la membrana celular, pasando por varios intermediarios inestables hasta alcanzar el estado de post-fusión más estable. El resultado de este cambio conformacional es el acercamiento de la membrana viral y celular, con la consiguiente fusión de las membranas y la formación de un poro de fusión por el que la nucleocápsida viral pasa al citoplasma celular (Figura 4) (Melero, 2017).

Una vez que penetra el genoma viral en el interior celular, la transcripción y replicación del virus suceden en el citoplasma de la célula. La transcripción se inicia en un único promotor en el extremo 3' del genoma al que se une la polimerasa para iniciar la transcripción secuencial a través de un mecanismo "*start-stop*" dirigido por las secuencias GS y GE de cada uno de los genes (Figura 4) (Kuo et al., 1996). La polimerasa reconoce la secuencia GS e inicia la transcripción del gen hasta llegar a la secuencia GE donde para la transcripción y libera el transcrito. La polimerasa seguirá la transcripción uniéndose a la secuencia GS del siguiente gen. Sin embargo, durante este proceso, una parte de las moléculas de la polimerasa no iniciarán de nuevo la transcripción, produciéndose un gradiente en el que los genes más próximos al promotor serán transcritos con mayor frecuencia (Figura 4) (Collins et al., 2013). En el caso de la transcripción del gen L, la polimerasa debe volver hacia atrás 68 nt hasta encontrar la secuencia GS del gen L ubicada en la región codificante del gen M2, por lo que se produce una atenuación adicional de su transcripción.

El cambio de la transcripción a la replicación del VRSH está mediado por los niveles de la proteína M2-II. Altos niveles de esta proteína inhiben la transcripción y aumentan los niveles de replicación (Bermingham and Collins, 1999). Una vez

producidas las proteínas del virus, la replicación se inicia en el primer nt del extremo 3' del genoma (Noton et al., 2010, Noton and Fearn, 2011). La polimerasa ignora las señales GS y GE y produce un RNA intermediario complementario al RNA genómico de longitud completa y polaridad positiva, denominado antígeno. Este RNA de polaridad positiva sirve como molde para que la polimerasa pueda generar las copias de RNA genómico (Noton et al., 2012). Tanto los RNAs genómicos como antígenicos se asocian a la proteína N a medida que se van sintetizando. Posteriormente, las moléculas de RNA genómico interactúan con las proteínas L, P y M2-I del virus para formar la nucleocápsida viral (Fearn et al., 2000, Hanley et

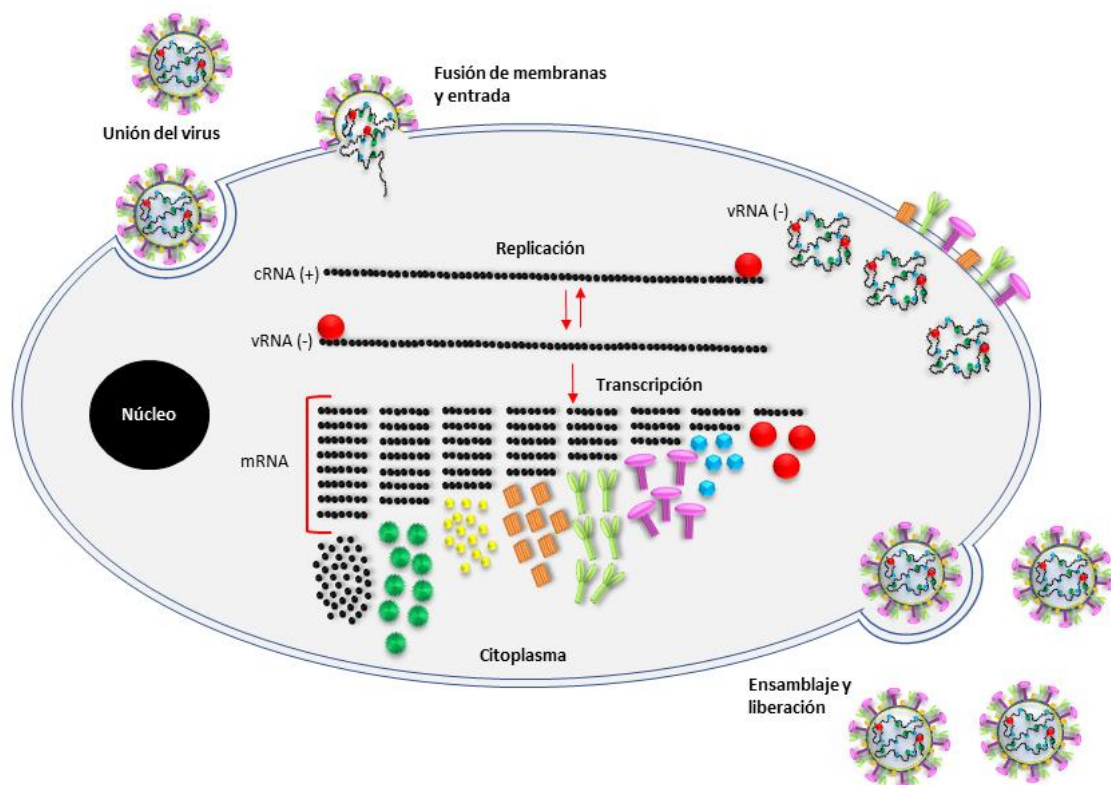


Figura 4. Esquema del ciclo replicativo del VRS. Se muestra la entrada del genoma viral (RNAv) al citoplasma celular donde se lleva a cabo la transcripción secuencial de los genes virales. La replicación del genoma tiene lugar a través de un RNA copia complementario y de polaridad positiva que actúa como intermediario. Por último, las proteínas del virus migran hacia la membrana plasmática de la célula donde se empaquetarán y saldrán por gemación al exterior celular adquiriendo la membrana de la célula hospedadora. (Noton et al., 2010).

Una vez sintetizado todo el material viral, se produce el ensamblaje de la partícula viral en los “*lipid rafts*” de la membrana plasmática celular. En estas

regiones se ensamblan las glicoproteínas de superficie (G, F y SH) junto con la proteína M del virus, formando parches que excluyen a las glicoproteínas celulares. La proteína M forma una capa bajo la membrana plasmática coordinando el ensamblaje del resto de las proteínas virales. La proteína M, junto a los microtúbulos y la actina celular, promueve la migración de las nucleocápsidas formadas en el citoplasma hacia la membrana plasmática. Las diferentes interacciones entre la proteína M y las glicoproteínas de superficie promueven el empaquetamiento y liberación de la partícula viral al exterior celular, proceso durante el cual el virus adquiere la envuelta lipídica a partir de la membrana plasmática de la célula infectada (Figura 4) (Melero, 2017, Collins, 2013, Collins et al., 2013, Muniyandi et al., 2018, Zhang et al., 2002).

2. Respuesta inmune frente al VRSH

El sistema inmune juega un papel esencial en el control de la infección por el VRSH, pero también en su patología. Las células epiteliales respiratorias infectadas producen una gran cantidad de citoquinas y quimioquinas de manera localizada, desencadenando una respuesta inflamatoria, de la que dependerá en gran medida el grado de patología de la infección (Collins, 2013, Russell et al., 2017).

2.1. Respuesta inmune innata temprana

En la infección por el VRSH la respuesta inmune innata se inicia en las células epiteliales de las vías respiratorias, principales dianas del virus. Aunque el VRSH también puede infectar macrófagos y células dendríticas, estas células son menos permisivas a la infección. Las células infectadas liberan una serie de mediadores inflamatorios y restos de partículas virales que alertan al sistema inmune innato de la presencia de una infección y establecen un estado antiviral localizado. La infección por el VRSH es detectada en las células epiteliales mediante los denominados “receptores de reconocimiento de patrones” (PRR, Pattern Recognition Receptors) (Takeuchi and Akira, 2010) que reconocen los llamados “patrones moleculares asociados a patógenos” (PAMPs, Pathogen-Associated Molecular Patterns) que, en el caso del VRSH, son principalmente los RNAs virales con extremo 5'-trifosfato y el RNA de doble cadena que se produce durante la replicación (Welliver, 2008, Kohlmeier and Woodland, 2009, Schmidt and Varga, 2017). Estos receptores celulares desencadenan una respuesta

proinflamatoria en la que participan diferentes proteínas adaptadoras, quinasa y factores de transcripción. En la infección por el VRSH, los principales PRRs descritos son los receptores RLR (RIG-I Like Receptors), receptores TLR (Toll Like Receptors) y receptores NOD (NOD Like Receptors) (Takeuchi and Akira, 2010). Las principales quinasas que participan en la respuesta frente al VRSH se agrupan en dos complejos: (i) complejo canónico IKK α , IKK β e IKK γ /NEMO, (ii) complejo no canónico IKK ϵ y TBK1 (Figura 5). Estas quinasas activan los distintos factores de transcripción que darán lugar a la expresión de diferentes genes proinflamatorios y antivirales. Los factores de transcripción que principalmente se activan en la infección por el VRSH son: (i) factor nuclear κ B (NF- κ B), activado por el complejo canónico IKK $\alpha/\beta/\gamma$; (ii) factores reguladores de interferón 3 y 7 (IRF3/7) activados por el complejo no canónico TBK1/IKK ϵ ; (iii) factor de transcripción de la proteína 1 activadora (AP-1) activado por proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Figura 5). La activación y translocación de los factores de transcripción hacia el interior del núcleo celular inducirá la expresión de interferón de tipo I (IFN-I), citoquinas, quimioquinas y moléculas antivirales (Welliver, 2008, Martínez et al., 2007, Kumar et al., 2011).

En la infección por el VRSH, se ha descrito que los interferones I y III son los principales mediadores de la respuesta inmune innata, inducidos a través de la activación de RIG-I. Los factores de transcripción claves en la producción de IFN son los IRF3 e IRF7 que son activados por el complejo de quinasas TBK1/IKK ϵ /NEMO (Figura 5) (Kalliolias and Ivashkiv, 2010). El IFN secretado puede actuar mediante la unión a sus receptores (IFNAR) de una forma autocrina o paracrina para activar la cascada de señalización mediada por JAK/STAT (quinasa Janus/activador de transcripción y transductor de la señal), dando lugar a la expresión de los denominados genes estimulados por IFN (ISGs, interferon stimulated genes) con potente actividad antiviral (Sun and Lopez, 2017, Gonzalez-Sanz et al., 2016).

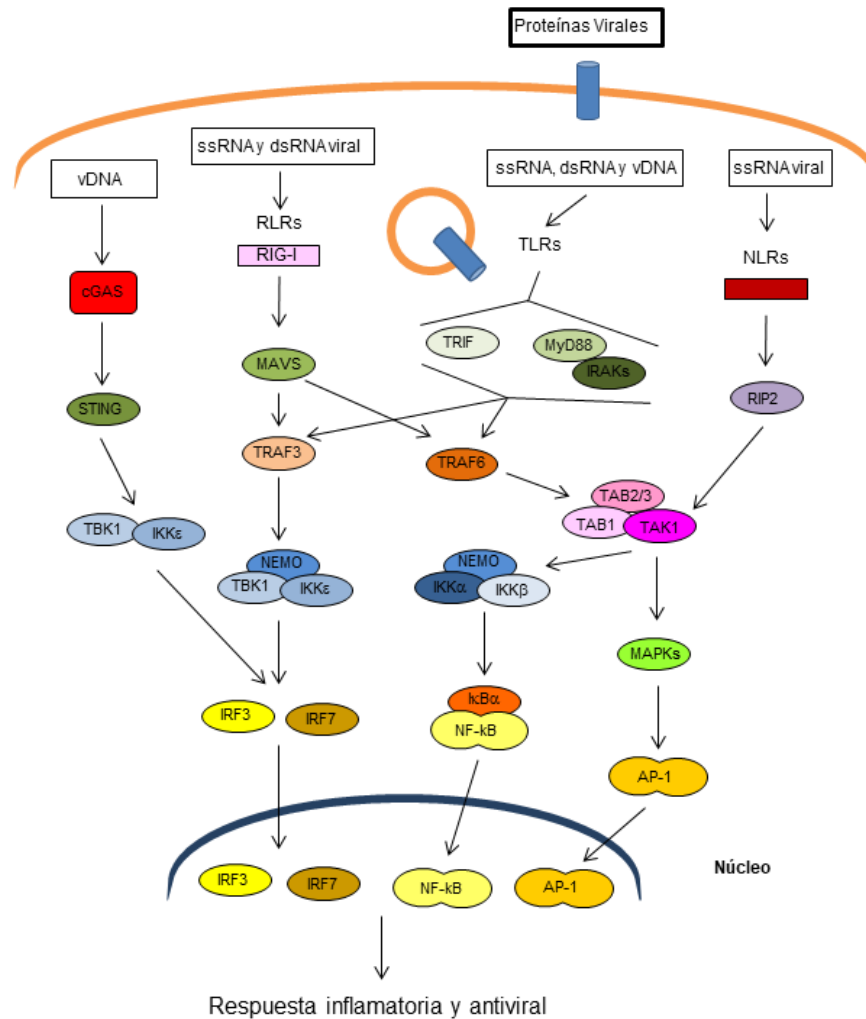


Figura 5. Cascada de señalización intracelular. Esquema de las principales rutas de la respuesta inmune innata desencadenadas por la activación de las diferentes familias de receptores PRRs. Tras el reconocimiento de los PAMPs por los diferentes receptores celulares (cGAS, RLR, TLRs y NLRs), la señalización se propaga a través de proteínas adaptadoras (STING, MAVS, TRIF, MyD88 y RIP2 respectivamente) hacia la activación de moléculas de la familia de las TRAFs (TRAF3/6) y de diferentes complejos de quinasas (Ikka/β/γ, TBK1/IKKε, TAK1/TAB 1/2/3, MAPKs) dando lugar a la activación de los factores de transcripción IRF3/7, NF-κB y AP1 y la expresión de IFN-I, citoquinas proinflamatorias y otros genes antivirales. vDNA, DNA viral; ssRNA, RNA viral de cadena simple; dsRNA, RNA viral de cadena doble.

2.1.1. Receptores RLR (RIG-I Like Receptors)

Esta familia de receptores está compuesta por tres tipos de receptores intracelulares: RIG-I (Retinoic acid Inducible Gene I), MDA5 (Melanoma Differentiation-Associated protein 5) y LGP2 (Laboratory of Genetics and Physiology 2). Estos receptores están formados por dos dominios de reclutamiento de caspasas en su región N-terminal (CARDs), un dominio central RNA helicasa y un dominio de regulación en el extremo C-terminal (CTD). Se encuentran localizados en el

citoplasma y reconocen el RNA viral de cadena simple y doble. Desencadenan las rutas asociadas a la activación de los factores de transcripción IRF3/7 y NF- κ B, en las que intervienen TRAF3/6 (TNF Receptor Associated Factor 3 y 6) (Figura 5). TRAF3/6 pertenecen a la familia TRAF, proteínas adaptadoras caracterizadas por un dominio TRAF en su extremo C-terminal que permite la interacción con otras proteínas, y un dominio RING (Really Interesting New Gene) en su extremo N-terminal que les proporciona actividad E3 ubiquitina ligasa (Arguello et al., 2014). En la infección por el VRSH, RIG-I es el principal receptor que reconoce el RNAv e induce la cascada de señalización de la respuesta inmune innata (Figura 5) (Kohlmeier and Woodland, 2009, Takeuchi and Akira, 2010, Okamoto et al., 2017).

2.1.2. Receptores TLR (Toll Like Receptors)

Es una de las familias mejor caracterizadas que detecta PAMPs procedentes del medio extracelular, pero también procedentes de endosomas y lisosomas intracelulares. Pertenecen a los receptores transmembrana de tipo I con repeticiones ricas en leucinas en el extremo N-terminal (Welliver, 2008, Takeuchi and Akira, 2010). Están ampliamente distribuidos en las vías respiratorias de varios tipos celulares, incluyendo las células epiteliales respiratorias, macrófagos alveolares, y células dendríticas (Oshansky et al., 2009).

En la infección por el VRSH, principalmente participan los receptores TLR3 y TLR4 que activan la cascada de señalización mediada por TRAF3/6 para activar la transcripción de diferentes genes de respuesta inmune inflamatoria y antiviral (Takeuchi and Akira, 2010). En las células epiteliales pulmonares infectadas por el VRSH se ha observado la activación de TLR3, y como consecuencia, un incremento en los niveles de expresión de CXCL10 (IP10) y CCL5 (RANTES) (Rudd et al., 2005). Por otro lado, la proteína F del VRSH es reconocida por los receptores TLR4 en monocitos humanos (Kurt-Jones et al., 2000). La activación de otros receptores TLR, como TLR7 y TLR9, localizados en los endosomas de las células dendríticas plasmacitoides, también se ha relacionado con las infecciones por virus respiratorios de RNA de cadena simple (Welliver, 2008, Kohlmeier and Woodland, 2009).

2.1.3. Receptores NLR (NOD Like Receptors)

Los receptores del tipo NOD (NLR) actúan como sensores de patógenos citoplasmáticos. Están formados por un dominio central de unión a nucleótidos, un dominio C-terminal de repeticiones ricas en leucinas y un dominio N-terminal a través del cual interaccionan con otras proteínas. La señalización intracelular desencadenada por los NLRs está mediada por el receptor de interacción con serina/treonina quinasa 2 (RIP2), y desemboca en la activación de los factores de transcripción NF- κ B y AP1 (Figura 5) (Okamoto et al., 2017).

2.2. Respuesta inmune adaptativa

En las infecciones por el VRSH, la respuesta inmune adaptativa es fundamental para la resolución de la infección. Sin embargo, la respuesta inmune protectora que se genera frente al VRSH es muy débil y de vida corta, lo que dificulta una inmunidad completa y favorece las reinfecciones a lo largo de la vida. No obstante, la sintomatología de las infecciones sucesivas es menos severa que en la infección primaria (Sun and Lopez, 2017).

En la respuesta humoral frente al VRSH, varias proteínas del virus son capaces de inducir la producción de anticuerpos, tales como N, la P o la M2-I. Sin embargo, la inducción de anticuerpos neutralizantes solamente se ha visto para el caso de las glicoproteínas G y la F (Oshansky et al., 2009). Varios estudios han mostrado una correlación positiva entre los niveles séricos de IgG frente al VRSH y los niveles de IgA procedentes de lavados nasofaríngeos, con una mayor protección frente a la infección por el VRSH (Glezen et al., 1981, Piedra et al., 2003, Falsey, 2007, Luchsinger et al., 2012, Chu et al., 2014, Habibi et al., 2015). Además, se han detectado altos títulos de anticuerpos neutralizantes frente al VRSH en el suero de niños recién nacidos, transferidos a través de la placenta materna. Este paso de anticuerpos hacia el feto favorece la inmunización pasiva del recién nacido y le protege de la infección durante los primeros meses de vida (Oshansky et al., 2009, Chu et al., 2014, Brandenburg et al., 1997). Altos títulos de anticuerpos neutralizantes en el suero de recién nacidos se han correlacionado con una menor frecuencia de infecciones graves causadas por el VRSH. Este dato explica el mayor riesgo de los niños prematuros a padecer una infección más severa, ya que tienen un menor título de anticuerpos neutralizantes (Holberg et al., 1991, Collins, 2013).

La importancia de los anticuerpos en la protección frente a la infección por el VRSH está avalada también por el empleo de un anticuerpo monoclonal neutralizante frente a la proteína F (palivizumab). Este anticuerpo es el único tratamiento disponible en la actualidad capaz de reducir el número de hospitalizaciones por el VRSH cuando se usa de forma preventiva (Chu and Englund, 2013).

En cuanto a la respuesta celular, los linfocitos T son esenciales para el aclaramiento del virus. Se ha demostrado que la eliminación del virus puede prolongarse en el tiempo en individuos inmunocomprometidos. Este aumento en el tiempo de eliminación del virus también se ha visto en animales de experimentación en los que se eliminaron los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ y donde, además, se observa un menor daño pulmonar, lo que demuestra que ambos tipos celulares están implicados en el aclaramiento del virus y en su patología (Graham et al., 1991). En un estudio llevado a cabo en niños inmunodeprimidos, también se observó un incremento en el tiempo de eliminación de la infección, en comparación con el tiempo medio en niños sanos (Lenschow et al., 2005).

La severidad de la infección por el VRSH parece estar relacionada principalmente con una respuesta inmune inadecuada, ya que el VRSH tiene un efecto poco citopático. La activación de esta respuesta inmune en las células infectadas por el VRSH lleva asociada una alta producción de citoquinas y quimioquinas que atraen al lugar de la infección diferentes tipos de células, tales como los neutrófilos, basófilos, macrófagos, linfocitos, etc. (Newton et al., 2016). Este incremento de mediadores inmunes en las vías respiratorias puede dar lugar a un proceso inflamatorio descontrolado, lo que puede terminar dañando el epitelio respiratorio (Oshansky et al., 2009). La hiperreactividad y producción de moco en las vías respiratorias producidas por el VRSH también son propias del asma. La producción de citoquinas mediada por un incremento en los niveles de linfocitos T CD4⁺ del subtipo 2 (Th2) se ha correlacionado con la severidad de la infección por el VRSH en pacientes pediátricos (Varga and Braciale, 2013, Legg et al., 2003, Roman et al., 1997).

2.3. Modulación de la respuesta inmune por proteínas del VRSH

Se han descrito distintos mecanismos por los cuales el VRSH es capaz de evadir o inhibir la respuesta inmune del hospedador. El más estudiado es la

inhibición de IFN-I por las proteínas NS1 y NS2 del VRSH, aunque la proteína G y la N también presentan propiedades inmoduladoras (Openshaw et al., 2017).

Las proteínas NS1 y NS2 del virus son claves para la inhibición de la producción y señalización de interferón en las células infectadas por el VRSH. Estas proteínas son capaces de evadir la respuesta inmune del hospedador mediante diferentes mecanismos: (i) La proteína NS2 se une a uno de los dominios CARD de RIG-I y la proteína NS1 se une a MAVS (Mitochondrial Antiviral-Signaling Protein), previniendo la interacción de RIG-I con MAVS, y afectando a la respuesta inmune innata (Ling et al., 2009). (ii) La proteína viral NS1 se une a IRF3, lo que impide su unión al promotor de IFN- β (Ren et al., 2011). (iii) Ambas proteínas, NS1 y NS2, favorecen la degradación de STAT2 vía proteasoma, inhibiendo la señalización dependiente de IFN y reduciendo la expresión de ISGs (Lo et al., 2005). (iv) La proteína NS1 sola, o en combinación con NS2, inhibe la maduración de las células dendríticas, atenuando su eficacia como células presentadoras de antígenos y la producción de citoquinas y quimioquinas (Munir et al., 2008). (v) Las dos proteínas no estructurales del virus suprimen la respuesta antiviral del hospedador, inhibiendo la apoptosis de las células infectadas y favoreciendo la activación de moléculas de supervivencia celular (Bitko et al., 2007).

A parte de las proteínas no estructurales, la proteína G soluble puede actuar como señuelo, uniéndose a los anticuerpos neutralizantes específicos frente a la proteína G, lo que disminuye la neutralización del virus (Collins, 2013). Esta conformación soluble puede también unirse a los receptores CX3CR1 de las células dendríticas, y de algunos linfocitos, e inducir una quimiotaxis alterada reduciendo su función (Openshaw et al., 2017). Por último, la nucleoproteína del virus puede interrumpir la sinapsis inmunológica formada entre las células T CD4⁺ y las células T CD8⁺ citotóxicas, al interaccionar con el complejo mayor de histocompatibilidad de las células T (Céspedes et al., 2014).

3. Regulación de la respuesta inmune innata por procesos de ubiquitinación y deubiquitinación

Las cascadas de señalización intracelular activadas por el reconocimiento de patógenos se encuentran finamente reguladas por procesos de ubiquitinación/deubiquitinación y fosforilación, entre otros. Estas modificaciones

postraduccionales modulan la actividad, localización, y señalización de las proteínas que intervienen en las rutas de señalización, ajustando su funcionamiento de forma precisa para evitar posibles daños tisulares mediados por una respuesta inmune inadecuada.

3.1. Ubiquitinación: mecanismo enzimático

La ubiquitina es una proteína de pequeño tamaño que consta de 76 aminoácidos conservados en todos los organismos eucariotas. Puede unirse covalentemente a lisinas (K) de las proteínas diana, modificando así su actividad o estabilidad mediante un proceso denominado ubiquitinación (Davis and Gack, 2015). La ubiquitinación es un proceso enzimático de tres pasos en el que participan tres enzimas diferentes. En un primer paso, la enzima activadora de ubiquitina (E1) activa la molécula de ubiquitina en un proceso dependiente de ATP. En segundo lugar, la E1 se une a la enzima conjugadora de ubiquitina (E2) para transferirle la molécula de ubiquitina activada. Por último, la enzima con actividad ubiquitina ligasa (E3) interacciona con la E2 para unir la ubiquitina a la proteína diana por medio de un enlace isopeptídico (Figura 6). Es la enzima E3 la que determina la especificidad del sustrato, existiendo un gran número de proteínas con actividad E3 ligasa que se clasifican en cuatro familias: RING (Really Interesting New Gene), HECT (Homologous to E6-associated protein C-Terminus), U-box (UFD2 homology) y RBR E3 ligasa (RING-in-between-RING) (Davis and Gack, 2015, Maelfait and Beyaert, 2012).

Las moléculas de ubiquitina pueden unirse a la proteína diana como un único residuo (monoubiquitinación), como dos residuos (diubiquitinación), o como una cadena de ubiquitinas (poliubiquitinación). Las uniones entre las ubiquitinas se forman a través de un enlace covalente entre el extremo C-terminal de la glicina de una ubiquitina con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral de una lisina de otra ubiquitina. La ubiquitina tiene siete residuos de lisina internos (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) por los que se pueden formar siete tipos diferentes de cadenas de ubiquitina con diferentes funciones (Ikeda et al., 2010, McDowell and Philpott, 2013, Davis and Gack, 2015). Las uniones más estudiadas son: (i) La unión de ubiquitinas vía lisina de la posición 48 (K48) marca a la proteína diana para ser degradada por medio del proteasoma. (ii) La unión de ubiquitinas vía lisina de la posición 63 (K63)

marca a la proteína diana activando la señalización intracelular. (iii) La unión del extremo C-terminal de una ubiquitina al extremo N-terminal de la metionina de otra ubiquitina dando lugar a una poliubiquitinación lineal (M1) o cabeza-cola, cuyo papel es activar la señalización celular por TNF- α e interleuquina 1 β (IL-1 β) (Davis and Gack, 2015, Zinngrebe et al., 2014).

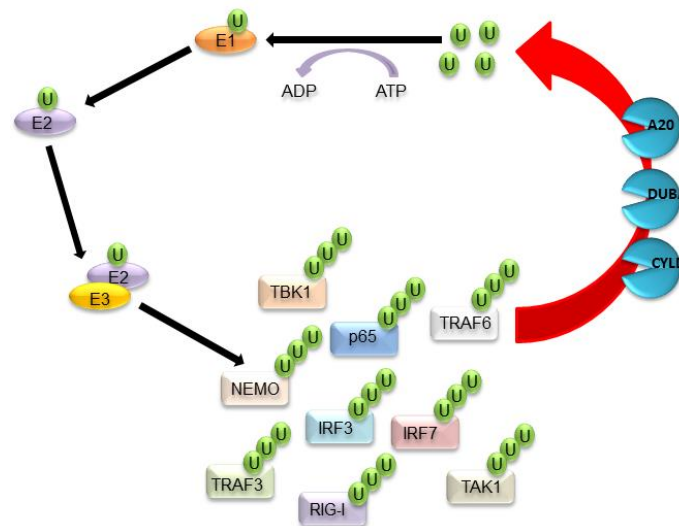


Figura 6. Procesos de ubiquitinación y deubiquitinación. La adición de residuos de ubiquitina a la proteína diana se realiza por medio de tres pasos enzimáticos. Se inicia con la activación del residuo de ubiquitina, lo que implica un consumo energético de ATP. Los residuos o cadenas de ubiquitina irán pasando a la enzima E2 y por último a la E3 con actividad ligasa, que une la ubiquitina a la proteína diana. Estos mismos residuos de ubiquitina son reconocidos por deubiquitininas, las cuales liberan la ubiquitina de la proteína diana para volver a ser utilizada en nuevos procesos.

3.2. La ubiquitinación es un proceso reversible

Los residuos de ubiquitina pueden ser retirados de la proteína diana en un proceso denominado deubiquitinación en el que intervienen proteínas con actividad proteasa o metaloproteasa conocidas como deubiquitininas (DUBs). En este proceso, la ubiquitina puede ser liberada al citosol o puede ser degradada por el proteasoma (Figura 6). Las DUBs se clasifican en 5 familias dependiendo de sus dominios catalíticos y mecanismos de acción: USP (Ubiquitin-Specific Proteases), OTU (Ovarian Tumor), UCH (Ubiquitin C-terminal Hydrolases), MJD (Machado-Josephin domain) y JAMM (JAB1/MPN/Mov34) (Davis and Gack, 2015, Zinngrebe et al., 2014, Maelfait and Beyaert, 2012, Harhaj and Dixit, 2011).

Estos procesos de ubiquitinación y deubiquitinación tienen como objetivo modular de forma precisa las cascadas de señalización implicadas en la respuesta inmune innata y adaptativa. El desajuste de estos procesos se ha asociado con la inmunopatología de varias enfermedades autoinmunes e inmunodeficiencias (Zinngrebe et al., 2014). Además, están también implicados en otros procesos celulares como la regulación del ciclo y muerte celular, endocitosis, autofagia y reparación del DNA (Maelfait and Beyaert, 2012).

3.3. Regulación de RIG-I mediante procesos de ubiquitinación y deubiquitinación

RIG-I está codificado por el gen *DExD/H-box helicase 58* (DDX58) y es el principal receptor de tipo RLR que se activa en las células epiteliales respiratorias durante la infección por el VRSH, desencadenando una cascada de señalización mediada por diferentes quinasas. En última instancia, se activan los factores de transcripción IRF3/7 y NF- κ B, dando lugar a la producción de IFN-I y otras citoquinas, así como otras proteínas antivirales. La actividad de RIG-I está finamente modulada por procesos de ubiquitinación y deubiquitinación, tanto activadores como inhibidores (Maelfait and Beyaert, 2012).

La actividad de RIG-I está regulada positivamente por TRIM25 (Tripartite Motif-containing protein 25) y RNF135 (RING Finger Protein 135, conocida como RIPLET o REUL). Tanto TRIM25 como RNF135 presentan un dominio RING en su extremo N-terminal con actividad E3 ligasa y un dominio variable PRY-SPRY en su extremo C-terminal (Maelfait and Beyaert, 2012, Martin-Vicente et al., 2017, Oshiumi et al., 2012). En la infección por el VRSH, RIG-I reconoce el extremo 5'-trifosfato de fragmentos pequeños de RNAv sin estructura CAP a los que se une por su dominio CTD, induciendo un cambio conformacional en RIG-I que expone los dominios CARDS con los que interacciona TRIM25 para añadir residuos de ubiquitina vía K63 y activar así a RIG-I. Del mismo modo, RNF135 (RIPLET) ubiquitina RIG-I vía K63 pero en su dominio CTD promoviendo también su activación (Figura 7) (Maelfait and Beyaert, 2012, Davis and Gack, 2015, Zinngrebe et al., 2014, Oshiumi et al., 2009). Esta activación de RIG-I permite que interaccione con las MAVS y se desencadene la cascada de señalización que dará lugar a una respuesta inflamatoria y antiviral (Okamoto et al., 2017, Martin-Vicente et al., 2017, Maelfait and Beyaert, 2012).

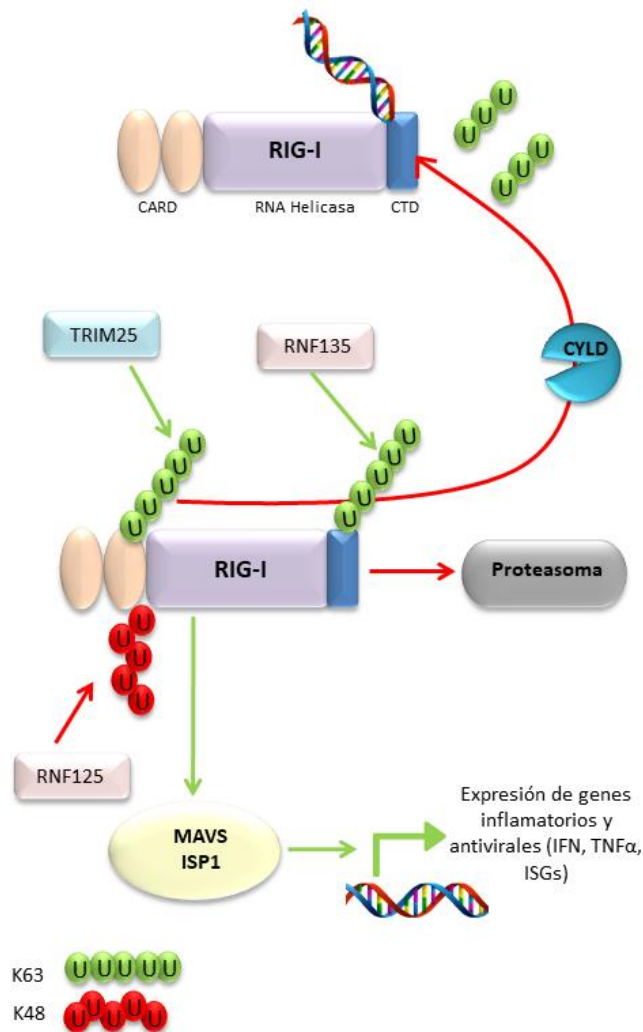


Figura 7. Regulación de RIG-I mediante procesos de ubiquitinación y deubiquitinación. En verde se marcan las regulaciones positivas de RIG-I que favorecen la inducción de la respuesta inmune. En rojo están señalizados aquellos procesos en los que se inhibe la cascada de señalización. TRIM25 ubiquitina los dominios CARDs de RIG-I, mientras que RNF135 (RIPLET) ubiquitina el extremo CTD y ambas ubiquitinaciones activan RIG-I para que éste pueda interactuar con las MAVS y desencadenar la expresión de genes inflamatorios y antivirales. Por el contrario, la actividad de RIG-I está modulada negativamente por RNF125 y CYLD. RNF125 añade cadenas de ubiquitina vía K48 para marcar a RIG-I e inducir su degradación por el proteasoma, mientras que CYLD libera las ubiquitininas unidas vía K63 a RIG-I, inactivando al receptor.

Por el contrario, hay otra serie de reguladores negativos de la actividad de RIG-I, tales como RNF125 (RING Finger Protein 125) y CYLD (Cylindromatosis). RNF125 pertenece a la familia de las proteínas con dominio RING y actividad E3 ligasa ubiquitinando los dominios CARDs de RIG-I vía K48, marcando a RIG-I para ser degradado vía proteasoma (Figura 7) (Maelfait and Beyaert, 2012, Oshiumi et al., 2012). CYLD, una deubiquitinasa que pertenece a la familia de las USP, se encarga de romper los enlaces de las cadenas de ubiquitina vía K63 de RIG-I, por lo que inhibe la interacción de RIG-I con MAVS (Figura 7). En ambos casos se inhibe la cascada de señalización intracelular desencadenada por RIG-I (Maelfait and Beyaert, 2012, Davis and Gack, 2015, Zinngrebe et al., 2014).

3.4. A20 (TNFAIP3)

En la regulación de la respuesta inmune mediada por RIG-I intervienen varias proteínas, entre las que se encuentra TNFAIP3 (TNF- α Induced Protein 3, también conocida como A20). A20 es una proteína de 790 aminoácidos que tiene una doble funcionalidad catalítica. Por un lado, presenta un dominio OTU en el extremo N-terminal con actividad deubiquitinasa, y por otro lado, una estructura de 7 dedos de zinc (ZnF) en su parte C-terminal que actúa como dominio E3 ubiquitina ligasa (Arguello et al., 2014, Catrysse et al., 2014, Harhaj and Dixit, 2011). A20 utiliza la actividad de sus dos dominios para modular los diferentes procesos celulares. Así, A20 actúa como regulador negativo de la inflamación mediada por NF- κ B (Shembade and Harhaj, 2012) y también regula la activación de los factores de transcripción IRF3/7 tras el reconocimiento de los RNAs virales por RIG-I (Saitoh et al., 2005).

Diferentes estudios han demostrado la formación de complejos de A20 con otras proteínas que determinan su actividad y/o especificidad de sustrato. Las proteínas más estudiadas con las que interacciona A20 son: (i) ABIN1 (A20-Binding Inhibitor of NF- κ B 1) que actúa como proteína adaptadora de A20 para facilitar su actividad E3 ligasa y DUB. (ii) TAX1BP1 (Tax1-Binding Protein 1), que presenta dos dominios de dedos de zinc en su extremo C-terminal, gracias a los cuales reconoce sustratos ubiquitinados sobre los que actúa A20. (iii) ITCH (Itchy E3 Ubiquitin Protein Ligase) presenta un dominio HECT E3 ligasa y actúa junto a TAX1BP1 tras la estimulación con TNF- α para el reclutamiento de A20 y la señalización vía RIP1. (iv) RNF11 (RING Finger Protein 11), es una E3 ligasa que puede interaccionar con diferentes reguladores como A20, TAX1BP1, ITCH, NEMO y ABIN1, y está relacionada con la regulación de NF- κ B (Harhaj and Dixit, 2011). Los complejos que forma A20 con varias de estas proteínas regulan la actividad de los factores de transcripción NF- κ B e IRF, controlando así la respuesta proinflamatoria generada frente a la infección de forma específica y rápida (Figura 8) (Catrysse et al., 2014, Shembade and Harhaj, 2012, Harhaj and Dixit, 2011).

Aparte de actuar como regulador negativo de la respuesta inmune y en procesos de inflamación, A20 ha sido descrita como inhibidor de la apoptosis celular al suprimir la actividad de la caspasa 8 y favorecer la supervivencia celular (Lim et al., 2017, Daniel et al., 2004). También se ha descrito la actividad antiapoptótica de varias proteínas que interaccionan con A20, como son TAX1BP1, ABIN1 e ITCH. La actividad de ABIN1 es similar a la de A20, inhibe la actividad de la caspasa 8 al interrumpir la unión entre FADD y la caspasa 8 para interaccionar con el complejo DISC (Oshima et al., 2009). La actividad de TAX1BP1 junto a ITCH ha sido descrita como inhibidora de la apoptosis inducida vía MAVS, ya que inducen su ubiquitinación vía K48 y posterior degradación por el proteasoma (Choi et al., 2017).

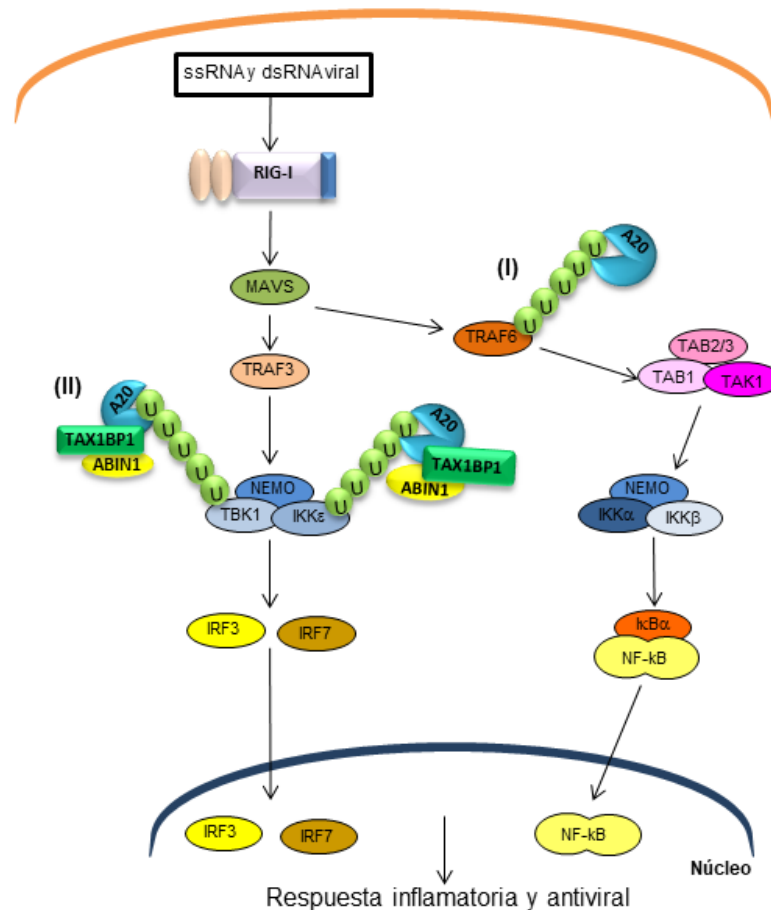


Figura 8. Papel de A20 como modulador de las cascadas de señalización intracelular desencadenadas por RIG-I. (I) A20 actúa retirando los residuos de ubiquitina unidos vía K63 a TRAF6 lo que inactiva al adaptador e inhibe la activación del factor de transcripción NF-κB. (II) El complejo formado por A20, TAX1BP1 y ABIN1 retira las cadenas de ubiquitina unidas vía K63 del complejo TBK1/IKK, lo que inhibe la activación de los factores de transcripción IRF3/7.

La expresión de A20 está regulada por el factor de transcripción NF- κ B, de forma que A20 inhibe su propia expresión, estableciéndose un mecanismo de retroalimentación negativo. En la mayoría de las células, los niveles basales de A20 son casi indetectables, pero tras la infección, NF- κ B se une a dos sitios de unión en el promotor de A20 y rápidamente desencadenan la expresión del gen. Como consecuencia, los altos niveles de A20 inhiben la activación del factor de transcripción NF- κ B, y con él, la expresión de la propia A20 (Ma and Malynn, 2012, Catrysse et al., 2014). A20 también está regulada por mecanismos de fosforilación, los cuales ayudan a regular la activación del factor NF- κ B (Catrysse et al., 2014).

3.4.1. Regulación de la respuesta inmune innata por A20

A20 interviene en numerosas rutas de señalización intracelular, como la iniciada por la activación del receptor de TNF- α (TNFR1). En este caso A20, actúa junto a TAX1BP1, ITCH y RNF11 retirando las cadenas de ubiquitina unidas vía K63 del adaptador RIP1, a la vez que ubiquitina a este mismo adaptador vía K48, favoreciendo su degradación en el proteasoma. Ambos procesos contribuyen a la inhibición de la señalización por TNF- α . Un papel similar del complejo se ha descrito en las rutas activadas por lipopolisacáridos o IL-1 β (Shembade et al., 2008, Shembade et al., 2009, Shembade et al., 2007, Catrysse et al., 2014).

A20 también interrumpe las cascadas de señalización desencadenadas a través de RIG-I mediante ubiquitinación/deubiquitinación de algunas proteínas que intervienen en esas cascadas (Arguello et al., 2014, Martin-Vicente et al., 2017). Además, se ha observado que A20 puede interrumpir las rutas de señalización intracelular mediante mecanismos no-catalíticos en los que compite con otras proteínas de unión a ubiquitina como NEMO, reduciendo así la fosforilación de IKK y, por tanto, la señalización y activación de NF- κ B (Bosanac et al., 2010, Skaug et al., 2011, Verhelst et al., 2012, Draber et al., 2015). Algunas de estas actividades de A20 requieren de la interacción con otras proteínas. El complejo formado junto a TAX1BP1 y ABIN1 corta las cadenas de ubiquitina vía K63 de las quinasas TBK1/IKK, lo que impide la fosforilación y translocación de IRF3/7 y la transcripción de genes de IFN (Figura 8) (Arguello et al., 2014, Catrysse et al., 2014, Ma and Malynn, 2012). En la señalización vía RIG-I, A20 también actúa retirando los

residuos de ubiquitina unidos a TRAF6, inhibiendo así la activación de NF- κ B (Figura 8) (Arguello et al., 2014).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo general de la esta tesis es entender la regulación de la respuesta inmune innata temprana en células epiteliales infectadas por el VRSH. En concreto se ha estudiado el papel de determinadas ubiquitininasas/deubiquitininasas celulares en la regulación de las rutas de señalización intracelular que dan lugar a la activación de factores de transcripción claves (NF- κ B e IRF3/7) en la inducción de la respuesta antiviral/inflamatoria contra el VRSH. Especialmente, se ha analizado el papel de TNFAIP3/A20, una deubiquitinasa fundamental en la regulación de numerosos procesos inflamatorios.

Los objetivos específicos son los siguientes:

- Analizar la inducción de TNFAIP3/A20 durante la infección por el VRSH en células epiteliales.
- Estudiar el efecto del silenciamiento de diferentes ubiquitininasas/deubiquitininasas en la actividad de RIG-I, un receptor esencial en la respuesta celular frente al VRSH.
- Investigar el efecto del silenciamiento de la expresión de A20 sobre la respuesta inmune y la producción de virus en células infectadas por el VRSH.
- Generar líneas celulares A549 “*knockout*” para A20 y estudiar en ellas la replicación del VRSH y la respuesta inmune innata.
- Estudiar el efecto de diferentes siRNAs frente a genes celulares y/o virales como posible tratamiento en la infección por el VRSH.

MATERIAL & MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Materiales

1.1. Material Biológico

1.1.1. Líneas celulares

Para el desarrollo del trabajo se emplearon las siguientes líneas celulares establecidas:

- A549, derivada de las células basales de un adenocarcinoma alveolar humano. Número ATCC: CCL-185.
- HEP-2, derivada de células HeLa (células epiteliales humanas de carcinoma de cérvix). Número ATCC: CCL-23.

1.1.2. Virus

Se ha empleado la cepa Long, perteneciente al grupo antigénico A del *virus respiratorio sincitial humano* (VRSH). Esta cepa fue aislada por primera vez en 1956 en Baltimore (Maryland, Estados Unidos) (Blount et al., 1956).

1.1.3. Bacterias

Los plásmidos utilizados en el trabajo se crecieron en la cepa bacteriana *Escherichia coli* DHa5.

1.1.4. Plásmidos

Se emplearon los siguientes plásmidos:

- pCMV6-Neo: Plásmido de expresión eucariota generado en el laboratorio a partir del plásmido comercial pCMV6-Neo-TNFAIP3 (Origene), del cual se liberó el inserto que codifica para TNFAIP3. Contiene los genes de resistencia a ampicilina y neomicina, y los promotores del citomegalovirus humano (CMV) y del fago T7. Se utiliza como plásmido control en los ensayos de sobreexpresión.

- pA20: Plásmido cedido por E. W. Harhaj (Zetoune et al., 2001) para la expresión de la proteína TNFAIP3 (A20) en células eucariotas. Contiene el gen de resistencia a ampicilina y el promotor del citomegalovirus humano.
- pTAX1BP1: Plásmido cedido por E. W. Harhaj (Shembade et al., 2007) para la expresión de la proteína TAX1BP1 en células eucariotas. Contiene el promotor del CMV y el gen de resistencia a ampicilina.
- pABIN1: Plásmido comercial TNIP1 (Myc-DDK-tagged)-Human TNFAIP3 interacting protein 1 (Origene RC204210) para células eucariotas que expresa la proteína ABIN1. Está clonado en un vector del tipo pCMV6-Entry, por lo que presenta el promotor del CMV y el gen de resistencia a kanamicina.
- H27583 TNFAIP3 TALEN-L y H27583 TNFAIP3 TALEN-R: Plásmidos de origen comercial que contienen el promotor de CMV y el gen de resistencia a ampicilina (TALEN Library Resource, Seoul National University) (Kim et al., 2013b). Expresan nucleasas (TALEN, Transcription Activator-Like Effector Nuclease) que reconocen y cortan secuencias específicas del gen *TNFAIP3*.

1.1.5. Medios de cultivo

1.1.5.1. Medios para el cultivo de células eucariotas

- Ambos tipos celulares (A549 y HEp-2) fueron crecidos y mantenidos en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, HyClone), suplementado con suero fetal bovino (SFB, Biological Industries) a una concentración del 10% (DMEM10) o del 2% (DMEM2), 4mM L-Glutamina (Lonza), 100 U/ml de penicilina (Hyclone) y 100 µg/ml de estreptomicina (HyClone).
- Para la titulación del VRSH se empleó DMEM-agar, medio DMEM2 preparado con una concentración final del 0,7% de agarosa (Low Melting Sieve Agarose, Conda).
- Las células se transfectaron en medio OPTIMEM (Gibco).
- Las células se desprendieron de las placas de cultivo con una solución de Tripsina-Verseno (0,25% Tripsina (Lonza) y 0,02% EDTA en PBS).

1.1.5.2. Medios para el crecimiento de bacterias

- Medio LB líquido: 1% bacto-triptona, 0,05% extracto de levadura y 1% NaCl (MP Biomedicals).
- Medio LB agar: 1% bacto-triptona, 0,05% extracto de levadura, 0,05% NaCl y 1,5% de agar (Conda, Pronadisa).

1.2. Reactivos

1.2.1. RNAs de interferencia pequeños (siRNA)

Se emplearon los siguientes siRNAs:

GEN DIANA	ID	CASA COMERCIAL
<i>TNFAIP3</i> (A20)	s14259	Ambion
<i>TAX1BP1</i>	s16984	Ambion
<i>TNIP1</i> (ABIN1)	s20174	Ambion
<i>ITCH</i>	s38163	Ambion
<i>RNF11</i>	s25671	Ambion
<i>DDX58</i> (RIG-I)	s223614	Ambion
<i>TRIM25</i>	s15204	Ambion
<i>TRIM25</i> (TRIM25/VRSH-F)	s15206	Ambion
<i>RNF125</i>	s29811	Ambion
<i>RNF135</i>	s38809	Ambion
<i>TRAF3</i>	s14384	Ambion
<i>TRAF6</i>	s14389	Ambion
<i>RIPK2</i>	s248	Ambion
<i>CYLD</i>	s590	Ambion
<i>F</i> (VRSH-F)	AD20SZI	Ambion
<i>N</i> (ALN-RSV01; VRSH-N)	ADMSGPQ	Ambion
<i>DDX58/N</i> (RIG-I/VRSH-N)	AD89JSV	Ambion
Control Negativo	4390846	Ambion

Tabla 1: Información de los diferentes siRNAs empleados en la tesis.

1.2.2. Sondas q-PCR

La cuantificación de la expresión de genes se realizó por medio de sondas TaqMan específicas para cada gen:

GEN DIANA	REFERENCIA	ESPECIE	CASA OMERCIAL
<i>Actina-β</i>	Hs99999903_m1	Humano	Applied Biosystems
<i>DDX58</i> (RIG-I)	Hs00204833_m1	Humano	Applied Biosystems
<i>TRIM25</i>	Hs01116121_m1	Humano	Applied Biosystems
<i>TRAF3</i>	Hs00936781_m1	Humano	Applied Biosystems
<i>TRAF6</i>	Hs00939742_g1	Humano	Applied Biosystems
<i>RIPK2</i>	Hs015772686_m1	Humano	Applied Biosystems
<i>CYLD</i>	Hs00211000_m1	Humano	Applied Biosystems
<i>TNFAIP3</i> (A20)	Hs00234713_m1	Humano	Applied Biosystems
<i>TAX1BP1</i>	Hs00195718_m1	Humano	Applied Biosystems
<i>TNIP1</i> (ABIN1)	Hs00374581_m1	Humano	Applied Biosystems
<i>ITCH</i>	Hs00230354_m1	Humano	Applied Biosystems
<i>RNF11</i>	Hs00702517_s1	Humano	Applied Biosystems
<i>RNF125</i>	Hs00215201_m1	Humano	Applied Biosystems
<i>RNF135</i>	Hs00810675_m1	Humano	Applied Biosystems
<i>Nucleoproteína</i>	Ensayo a demanda	VRSH	Applied Biosystems
<i>IL-6</i>	Hs00985639_m1	Humano	Applied Biosystems
<i>ISG15</i>	Hs00192713_m1	Humano	Applied Biosystems
<i>TNF-α</i>	Hs00174128_m1	Humano	Applied Biosystems
<i>IFN-β</i>	Hs01077958_s1	Humano	Applied Biosystems
<i>CCL5</i>	Hs00982282_m1	Humano	Applied Biosystems
<i>IL-8</i> (CXCL8)	Hs00174103_m1	Humano	Applied Biosystems
<i>IL-1β</i>	Hs01555410_m1	Humano	Applied Biosystems

Tabla 2: Listado de las sondas específicas para cada gen empleadas en el trabajo

1.2.3. SYBR-Green

La cuantificación de determinados genes virales y celulares se llevó a cabo usando SYBR-Green (Power-Up SYBR-Green Master MIX, Applied Biosystems). Para ello, se diseñaron parejas de oligonucleótidos para amplificar fragmentos de entre 150 – 200 pares de bases:

GEN DIANA	NOMBRE	SECUENCIA 5' – 3'	Tm
ACTB	Fw-ACTB	CACCAACTGGGACGACAT	57
	Rv-ACTB	ACAGCCTGGATAGCAACG	57
NUCLEORPOTEÍNA VRSH	NF	CATGATTCTCCTGATTGTGGGATGA	59
	NR	TCACGGCTGTAAGACCAGATCTAT	59
PROTEÍNA DE FUSIÓN F	FUS-F2	ACCAGCAAAGTGTTAGACCTCAA	58
	FUS-R2	TCCCTGGTAATCTCTAGTAGTCTG	57
PROTEÍNA NS1-2	NS1-F2	GCTTTGGCTAAGGCAGTGAT	58
	NS1-R2	CCATTAGGTTGAGAGCAATGTG	56
POLIMERASA	Pol-F2	TGGCAGTTACAGAGGTTTTG	55
	Pol-R2	GCCCGTGAGGATATGTAGGTT	59
GLIPOCOPROTEÍNA G	ProtG-F3	CCTCAGCTTGAATCAGCTT	57
	ProtG-R3	GTGGTTTGTGTTTGGCGTTGTTT	57
MATRIZ	ProtM-F2	ACCCAAGGGACCTTCACT	58
	ProtM-R2	GTGTGGGGTTGAGTGTCTTC	58
FOSFOPROTEÍNA	ProtP-F2	GCTAGGGATGGTATAAGAGATGCC	59
	ProtP-R2	CTCTGATGTTGGATTGAGAGACACT	57

Tabla 3: Listado de las parejas de oligonucleótidos diseñadas para detectar por medio de SYBR-Green la expresión de los distintos genes del VRSH y del control interno de actina- β .

1.2.4. Oligonucleótidos empleados para secuenciación

Los oligonucleótidos empleados para comprobar la presencia y correcta orientación del inserto de los plásmidos empleados en el trabajo son los siguientes:

NOMBRE	SECUECIA 5' – 3'	GEN DIANA
TNFAIP3-F1	AAAACAGCGAGCAGGGGAGGAGAG	TNFAIP3 (A20)
TNFAIP3-F2	GACAGCACCCAGCCCTTTTC	TNFAIP3 (A20)
3.0-TNFAIP3-F	CTTGCCAGTTTTGTCTCAGTTTC	TNFAIP3 (A20)
TNFAIP3-R1	AGTTGGGCGTTTCACACATTTTACAT	TNFAIP3 (A20)
TNFAIP3-R2	GGTGGGGCCGAATGAGG	TNFAIP3 (A20)
2.0-TNFAIP3-R	GGAAGCCATTTTGATAAGATTG	TNFAIP3 (A20)
TNFAIP3 TALEN F1	CCTTTGCAACATCCTCAGAAG	TNFAIP3 (A20)
TNFAIP3 TALEN R1	ACTAACCAAGCAAGTCACAGAAC	TNFAIP3 (A20)
TAX1BP1-F1	TGGGAACAAAGAAAGCGTGATTAC	TAX1BP1
TAX1BP1-F2	CAGGCTGCAGTTATGTTTG	TAX1BP1
2,0-TAX1BP1-F	CAAAGGGGCAAGTCTGT	TAX1BP1
2,0-TAX1BP1-F2	GTGCTTTTACCCAGATGA	TAX1BP1
TAX1BP1-R1	CACGCTTTCTTTGTTCCCATCTAA	TAX1BP1
TAX1BP1-R2	CAGGTCTGCCATCGTTCT	TAX1BP1
2,0-TAX1BP1-R	TGTTTCAGGCATAGGGGACCATA	TAX1BP1

ABIN1-F1	CCGCATGGCCCTGGAGTTCAA	<i>TNIP1</i> (ABIN1)
ABIN1-F2	AGCGGGAGCAGAAGCAGCGTGA	<i>TNIP1</i> (ABIN1)
ABIN1-R1	CGAGAGGCTGCGGGAGGAAAATTT	<i>TNIP1</i> (ABIN1)
ABIN1-R2	GAGCATCCAAACCCGCCATCATC	<i>TNIP1</i> (ABIN1)
pCMV-Entry_F1	ATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACT	pCMV-Entry
pCMV-Entry_F2	CTCACGGGGATTTCGAAGTCTC	pCMV-Entry
pCMV-Entry_R1	ATTTTATTAGGACAAGGCTGGTG	pCMV-Entry
pCMV-Entry_R2	AACTTGCCCCTTGCTCCATACCA	pCMV-Entry
pCMV6-F	GGACTTTCCAAAATGTCTG	pCMV6-NEO
pCMV6-R	ATTAGGACAAGGCTGGTGGG	pCMV6-NEO

Tabla 4: Listado de los oligonucleótidos diseñados para secuenciar los insertos de interés en los plásmidos del trabajo.

1.2.5. Anticuerpos

Se emplearon una serie de anticuerpos comerciales dirigidos frente a diferentes proteínas celulares para comprobar su correcta expresión tras la transfección con los correspondientes plásmidos:

PROTEÍNA	REFERENCIA	CASA COMERCIAL
ACTINA- β	ab8224-100	Abcam
TNFAIP3 (A20)	ab167154	Abcam
TAX1BP1	ab176572	Abcam
ABIN1	ab207584	Abcam
Anticuerpo secundario anti-ratón	97040	Abcam
Anticuerpo secundario anti-conejo	6721	Abcam

Tabla 5: Listado de los anticuerpos empleados en el trabajo.

Los anticuerpos frente a las proteínas del VRSH como la nucleoproteína (79N), la glicoproteína G (021/1G, 021/2G), la glicoproteína F (476-510) y la proteína de la matriz (29M) fueron obtenidos previamente en el laboratorio (García-Barreno et al., 1989, Martínez et al., 1997).

1.2.6. Tampones y soluciones de trabajo

- Tampón TNE (50 mM Tris Base, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH 7.5)

- Tampón de lisis Tritón-Deoxicolato (10 mM Tris HCl, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% tritón X-100, 1% deoxicolato sódico, 0,1% SDS) con inhibidores de proteasas (Complete mini, Roche)
- Tampón ELISA (25 mM ácido cítrico, 50 mM Na₂HPO₄, pH 5.0)
- Tampón PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄)
- Tampón TBS (20 mM Tris Base, 137 mM NaCl, pH 7.6)
- Tampón TAE (40 mM Tris base, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA)
- Tampón de electroforesis de proteínas (25 mM Tris base, 192 mM Glicina, 0,1% SDS)
- Tampón “*mild stripping*” (200 mM Glicina, 3,46 mM SDS y 1% tween-20, pH 2.2)
- Tampón de transferencia de proteínas (25 mM Tris Base, 192 mM Glicina, 20% metanol)
- Tampón de carga de proteínas (62,5 mM Tris HCl pH 6.8, 10% Glicerol, 2% SDS, 0,1 M dithiothreitol (DTT), 0,01% azul de bromofenol)
- Tampón de carga de DNA (0,05% azul de bromofenol, 6,8% Glicerol)
- Tampón TBF-I (100 mM RbCl₂, 50 mM MnCl₂, 30 mM CH₃CO₂K, 10 mM CaCl₂, 15% Glicerol, pH 5.5)
- Tampón TBF-II (10 mM MOPS, 10 mM RbCl₂, 75 mM CaCl₂, 15% Glicerol, pH 6.5)
- Solución de teñir (0,05% Azul Comassie, 45% Metanol, 7% Ácido Acético)
- Solución de desteñir (25% Metanol, 7% Ácido acético)
- 4x Tris HCL-SDS pH 8.8 (1,5 M Tris-HCl, 0,4% SDS)
- 4x Tris HCL-SDS pH 6.8 (0,5 M Tris-HCl, 0,4% SDS)

1.2.7. Otros reactivos

- Transfecciones de células eucariotas: Lipofectamina 3000 (Invitrogen), Lipofectamina RNAiMax (Invitrogen).
- Cuantificación de apoptosis celular: Single Channel Dead Cell Apoptosis Kit (Invitrogen).
- Bacterias competentes: Acetato potásico (Sigma-Aldrich), cloruro de rubidio (Sigma-Aldrich), cloruro de calcio (Merck), cloruro de magnesio (Merck),

glicerol-87% (Merck), MOPS (Sigma-Aldrich), carbenicilina (Calbiochem), kanamicina (Gibco).

- Purificación de plásmidos: Agarosa (Low Melting Point, Conda), gel red (Invitrogen).
- Purificación y titulación de virus: Sacarosa (Merck), metanol (Merck), formaldehído (FA, Merck), dimetilsulfóxido (DMSO, Merck), 3-amino-9-etil-carbazol (AEC, Alfa-Aesar), albúmina sérica bovina (BSA, Amresco-VWR), polietilenglicol 6000 (PEG-6000, Merck).
- Cuantificación de proteínas y Western Blot: Reactivo BCA (Pierce BCA protein assay, Thermofisher), TEMED (Biorad), persulfato de amonio (PSA, Biorad), dodecilsulfato sódico (SDS, Biorad), acrilamida-bisacrilamida (Biorad), inmobilon-P membrane (Millipore), ECL (Clarity western ECL substrate, Biorad), tween20 (Amresco-VWR), agente de bloqueo (ECL Advance Blocking Reagent, GE Healthcare).

2. Métodos

2.1. Manipulación de células y virus

2.1.1. Cultivos celulares

2.1.1.1. Mantenimiento y conservación

El cultivo de células eucariotas, A549 y HEp-2, se llevó a cabo en placas petri con medio DMEM10 en una atmosfera del 5% de CO₂ y 37°C. El subcultivo de las células se realizó desprendiendo la monocapa celular con tripsina-verseno.

Las células se conservaron en nitrógeno líquido en una solución de SFB con DMSO a una concentración final del 10%.

2.1.1.2. Procesamiento de muestras celulares

Para la extracción de RNA, las células se levantaron con una solución de tripsina-verseno y se centrifugaron a 800 g durante 5 minutos. Seguidamente, se descartó el sobrenadante, se lavó el sedimento con PBS y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. El sedimento obtenido se almacenó a -80°C hasta su uso.

La extracción de proteínas se realizó de forma similar a la del RNA, pero levantando las células con ayuda de un raspador de goma. Posteriormente, se recogió el cultivo y se centrifugó a 800 g durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante, se lavaron las células con PBS y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Por último, se descartó el sobrenadante y se almacenó el sedimento a -80°C.

2.1.2. Virus

2.1.2.1. Infección con el VRSH

La cepa empleada en los ensayos de infección fue la cepa Long del grupo antigénico A. Las infecciones con el VRSH se realizaron mediante la inoculación del virus sobre la monocapa de células A549 o HEP-2, a la multiplicidad de infección (MOI) correspondiente. Para ello, las células se lavaron con medio DMEM2 y posteriormente se añadió el inóculo del virus diluido en el mismo medio. Pasados 90 minutos de adsorción a 37°C, se añadió DMEM2 hasta completar el volumen de cada pocillo y se incubaron a 37°C y una atmósfera del 5% de CO₂ el tiempo requerido para cada ensayo.

Las muestras de virus se obtuvieron recogiendo el sobrenadante de cada uno de los pocillos infectados. El sobrenadante se clarificó por centrifugación a 2.300 g durante 10 minutos y posteriormente se almacenó en criotubos para conservarlo en nitrógeno líquido hasta su análisis.

2.1.2.2. Purificación del VRSH

Para la purificación del VRSH, se infectaron placas de células HEp-2 subconfluentes a una baja multiplicidad de infección (0.5 unidades formadoras de placas (PFU)). La infección se incubó a 37°C durante aproximadamente 48 horas hasta que el efecto citopático fue generalizado. Tras este tiempo, se recogieron las células (con ayuda de un raspador de goma) junto con medio de cultivo y se congelaron en nitrógeno líquido. Este virus se empleó para infectar de nuevo un mayor número de células HEp-2. La infección se dejó progresar durante 3 días. Al cabo de este tiempo, se recogieron las células junto con el sobrenadante de cultivo y se centrifugaron a 3.220 g durante 20 min a 4°C. El sobrenadante así clarificado se incubó con polietilenglicol 6000 (PEG-6000) a una concentración final del 10%

durante 90 minutos a 4°C y con agitación suave para precipitar el virus. Posteriormente se recogió el precipitado por centrifugación a 3.220 g durante 30 min a 4°C, y se resuspendió y homogeneizó en tampón TNE 1X. La mezcla homogeneizada se depositó sobre un gradiente discontinuo de 30% - 45% de sacarosa en TNE y se ultracentrifugó a 150.000 g y 4°C durante 90 minutos. Finalmente se retiró la banda correspondiente al virus ya purificado localizada en la interfase entre las dos concentraciones de sacarosa, se repartió en alícuotas y se almacenó en nitrógeno líquido hasta su posterior titulación.

2.1.2.3. Titulación del VRSH

La cuantificación de las partículas virales infectivas se realizó en los sobrenadantes de las células infectadas mediante la inoculación de células HEp-2 confluentes en placas M6. Para ello se realizaron diluciones seriadas de los sobrenadantes que se añadieron por duplicado en pocillos M6 y se dejaron 90 minutos de adsorción a 37°C. Pasado este tiempo, se añadió DMEM-agar a los pocillos y las placas se incubaron durante 45 minutos a 4°C para que la agarosa se solidificara. Posteriormente, las placas se incubaron a 37°C durante cinco días. Una vez pasado este tiempo, se fijaron las células con formaldehído al 4% en tampón fosfato salino (PBS) durante 45 minutos y posteriormente se permeabilizaron las membranas con metanol durante 5 minutos. Seguidamente se lavaron las placas y se bloquearon los sitios de unión inespecíficos con BSA al 1% en tampón PBS durante al menos 30 minutos, antes de la adición de una mezcla de anticuerpos monoclonales primarios frente a la proteína G, P y F del VRSH (Martínez et al., 1997, García-Barreno et al., 1989). Una vez incubados los pocillos con la mezcla de anticuerpos primarios durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron las placas y se incubaron con un anticuerpo secundario anti-ratón-HRP (horseradish peroxidase) durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, el revelado de las placas se realizó incubando los pocillos en oscuridad durante 20 minutos con una mezcla de 3-Amino-9-ethylcarbazol (0.02% m/v) y peróxido de hidrógeno de 100 volúmenes (0.2% v/v) en tampón ELISA.

2.2. Manipulación de bacterias

2.2.1. Generación de bacterias competentes

Las bacterias *E. coli* DH5 α competentes se generaron creciéndolas en medio LB líquido con agitación hasta obtener una densidad óptica de entre 0.3 y 0.6 medida a 600 nm. Una vez crecidas las bacterias, se incubaron en hielo 5 minutos y se centrifugaron 10 minutos a 850 g y 4°C. El sedimento obtenido se resuspendió suavemente en una proporción de 50 ml de tampón TBF-I por cada 100 ml de cultivo inicial. El homogeneizado se volvió a incubar en hielo durante 5 minutos y a centrifugar 10 minutos a 850 g y 4°C. El sedimento se resuspendió suavemente en tampón TBF-II a una proporción de 4 ml de tampón por cada 100 ml de cultivo inicial, y se incubó en hielo durante 15 minutos. Pasado ese tiempo, las bacterias se distribuyeron en alícuotas de 50 μ l y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

2.2.2. Transformación, conservación y cultivo de bacterias competentes

Para la transformación de las bacterias se partió de un vial de 50 μ l de las bacterias competentes anteriores que se descongeló en hielo durante 20 minutos y se le añadió la mezcla de transformación (entre 3 – 5 ng del plásmido en un volumen máximo de 3 μ l). Una vez añadida la mezcla de transformación, se incubaron las bacterias otros 20 minutos en hielo, seguido de un choque térmico de 42°C durante 1,5 minutos y 1 minuto de nuevo en hielo. Pasado ese tiempo, se añadió a cada vial 0,5 ml de medio LB líquido sin antibiótico y se dejaron incubando en agitación a 37°C durante 30 minutos. Se extendieron 50, 100 y 200 μ l de las bacterias transformadas en placas con medio LB sólido y 50 μ g/ml de carbenicilina o kanamicina (este último solamente para el plásmido de ABIN1) y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

Las colonias aisladas se crecieron en medio LB líquido con antibiótico (50 μ g/ml del antibiótico correspondiente) y agitación a 37°C durante 18 horas. Por último, se añadió glicerol a los cultivos bacterianos hasta una concentración final del 25%, se hicieron alícuotas y se almacenaron a -80°C.

2.2.3. Extracción de plásmidos de bacterias

Las bacterias transformadas con cada plásmido se crecieron en medio LB líquido con antibiótico a 37°C y agitación durante 18 horas. Pasado ese tiempo, se centrifugaron a 5.000 g para obtener el sedimento de bacterias. La extracción de los plásmidos se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante mediante los kits de extracción comerciales “QIAprep Spin MiniPrep Kit” y “QIAprep Spin MaxiPrep Kit” (Qiagen) a partir de 3 ml o 100 ml de medio de cultivo respectivamente. El DNA obtenido se cuantificó por medio de un espectofotómetro “BioPhotometer Plus” (Eppendorf) y se almacenó a -80°C.

2.2.4. Generación del plásmido control

El plásmido pCMV6-NEO se generó en el laboratorio a partir de la liberación del inserto que codifica para TNFAIP3 en el plásmido comercial pCMV6-NEO-TNFAIP3 (Origene). Para ello se trató 1 µg del plásmido comercial con 1 µl de la enzima “FastDigest NotI” (Fermentas) incubándolo a 37°C durante 30 minutos. Una vez digerido, se separaron los productos por electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%, se cortó la banda correspondiente al plásmido sin el inserto y se extrajo el DNA con el kit comercial “QUIAEX Gel Extraction Kit” (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA extraído se re-ligó con el kit “Rapid DNA Ligation Kit” (Roche) siguiendo el protocolo del fabricante y una décima parte del plásmido purificado se utilizó para transformar las bacterias competentes *E. coli* DH5α. Una vez crecidas, se purificó el plásmido y se corrió en un gel de agarosa al 0,8% junto al plásmido inicial para comparar su movilidad. Para comprobar que el plásmido no tenía inserto, se secuenció con los oligonucleótidos pCMV6-F y pCMV6-R (Tabla 4). Las bacterias transformadas con el nuevo plásmido (pCVM6-NEO) se almacenaron a -80°C en diferentes alícuotas.

2.3. Manipulación de RNA

2.3.1. Extracción de RNA de células eucariotas

La extracción del RNA total se realizó siguiendo las instrucciones facilitadas por los fabricantes mediante el kit comercial “ReliaPrep RNA Cell Miniprep System” (Promega). El RNA total extraído fue cuantificado por medio de un espectofotómetro

“BioPhotometer Plus” (Eppendorf) y seguidamente fue alicuoteado y almacenado a -80°C hasta su uso.

2.3.2. Reacción de la transcriptasa inversa

Una vez extraído el RNA total, se generó un DNA complementario (cDNA) con oligonucleótidos aleatorios mediante transcripción inversa con el kit comercial “High-Capacity cDNA Archive Kit” (Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se partió de una concentración de RNA inicial de 0,05 µg/µl y se emplearon las condiciones estándar del fabricante: 10 minutos a 25°C, 2 horas a 37°C y un último paso de 5 minutos a 85°C. Finalmente, el cDNA fue almacenado a -80°C hasta su uso.

2.4. Manipulación de DNA

2.4.1. PCR a tiempo real (q-PCR)

La cuantificación de genes celulares y virales se llevó a cabo por triplicado en un termociclador “StepOne Real Time PCR System” (Applied Biosystems).

Para la cuantificación de los genes celulares se empleó una solución madre “5x PyroTaq PROBE qPCR Mix Plus” (Cultek) y sondas TaqMan MGB FAM dye-labeled (Applied Biosystems) para cada uno de los genes (Tabla 2). La reacción se llevó a cabo siguiendo las indicaciones de la casa comercial con una activación de la enzima de 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. Las muestras se prepararon en un volumen final de 50 µl en los que se añadieron 3 µl del cDNA de cada muestra. La expresión de los genes se normalizó respecto a la expresión de actina-β y la cuantificación relativa se realizó por el método comparativo CT ($\Delta\Delta C_T$) mediante el software StepOne v2.1.

La expresión de genes virales se cuantificó mediante SYBR-Green (Power-Up SYBR-Green Master Mix, Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se diseñó una pareja de oligonucleótidos para cada gen de interés (Tabla 3), incluyendo una pareja para el control interno de actina-β. Se realizaron diluciones 1:15 del cDNA de las muestras recogidas a las 24 hpi y diluciones 1:30 de las muestras recogidas a las 48 hpi. De estas diluciones se emplearon 3 µl de cada una en un volumen final de 50 µl de reacción. La qPCR se llevó a cabo en un

termociclador “StepOne Real Time PCR system” utilizando un programa estándar de: 2 minutos a 50°C, 2 minutos a 95°C y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 15 segundos a 60°C y 1 minuto a 72°C. La normalización y cuantificación se realizó como se describe en el párrafo anterior.

2.4.2. Secuenciación de DNA

Los plásmidos empleados a lo largo del trabajo fueron secuenciados para verificar la presencia y orientación de cada inserto. Para ello, se diseñaron unos oligonucleótidos específicos (Tabla 4) de los que se emplearon 6 pmol de cada uno, junto a 150 ng de DNA plasmídico por cada 4Kb de plásmido y agua hasta completar un volumen de 10 µl. La secuenciación se llevó a cabo en el servicio de secuenciación del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III en Majadahonda.

2.5. Manipulación de proteínas

2.5.1. Extracción de proteínas totales

Las muestras de células recogidas fueron manipuladas en hielo y lisadas para extraer las proteínas totales con tampón de lisis Triton-Deoxicolato con 0,1% de SDS e inhibidores de proteasas. El sedimento se incubó durante 20 minutos en hielo agitando con vórtex durante 10 – 15 segundos a intervalos de 5 minutos. Posteriormente, se centrifugó la mezcla a 15.700 g y 4°C durante 5 minutos y se almacenó el sobrenadante a -80°C.

2.5.2. Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas en los extractos se determinó mediante el método del BCA (ácido bicinconínico), utilizando una curva patrón de BSA realizada con concentración conocida desde 0,2 µg/µl a 1,2 µg/µl. La cuantificación de los extractos se realizó por triplicado, añadiendo 1 µl del extracto a cada pocillo y posteriormente 200 µl por pocillo de la mezcla de reactivos A y B del kit “Pierce BCA Protein Assay kit” (Thermofisher). Seguidamente, se incubó la mezcla a 37°C durante 20 minutos antes de leer la placa a una densidad óptica de 595 nm (Multiscan FC, Thermofisher).

Los resultados obtenidos, fueron exportados al programa informático GraphPad Prism 8 para la extrapolación de las concentraciones sobre la curva patrón de BSA generada.

2.5.3. Análisis de las proteínas mediante SDS-PAGE y Western Blot

Los extractos de proteínas fueron analizados por medio de electroforesis monodimensional en un gel de acrilamida con SDS (dodecilsulfato sódico, SDS-PAGE), a una concentración del 10% - 15% de acrilamida dependiendo del peso molecular de la proteína de interés. De cada muestra se cargaron 10 µg por pocillo en un volumen final de 20 µl de tampón de carga con dithiothreitol (DTT, Sigma). La separación se llevó a cabo en tampón de electroforesis y una vez finalizada, las proteínas se transfirieron a una membrana inmobilon-P (Millipore) en cámara fría usando tampón de transferencia. Posteriormente, la membrana se bloqueó con el agente de bloqueo (Advance Blocking Reagent, GE Healthcare) al 2% en tampón PBS con 0,05% de Tween-20 (Bio-Rad) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavó la membrana en tampón PBS-0,05% Tween-20 y se incubó sucesivamente con el anticuerpo primario y el secundario a temperatura ambiente durante 1 hora en la mezcla del agente bloqueante al 2%. Los lavados intermedios se realizaron en PBS-0,05% Tween-20. Por último, el revelado de la membrana se hizo incubando con sustrato ECL (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermofisher) y las proteínas fueron visualizadas por quimioluminiscencia usando ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad).

Para la reutilización de las membranas se realizó un “*stripping*” en el que se incubaron las membranas dos veces durante 7 minutos con el tampón de “*Mild Stripping*”, se lavaron dos veces con tampón PBS durante 10 minutos, dos veces con tampón TBS-0,05% Tween-20 durante 5 minutos y por último una vez con tampón PBS-0,05% Tween 20 durante 5 minutos. Una vez terminado el proceso, se volvió a bloquear la membrana con el agente bloqueante al 2% durante 30 minutos a temperatura ambiente.

2.6. Diseño de siRNAs

Los siRNAs frente al mRNA que codifica para la proteína de fusión del VRSH (*F*) (ID # AD20SZI) y el siRNA biespecífico frente a *DDX58* (RIG-I) y la

Nucleoproteína del VRSH (RIG-I/VRSH-N) (ID # AD89JSV), fueron diseñados en el laboratorio siguiendo una serie de reglas descritas por Algia A. y Eritja R: (i) El nucleótido de la posición 1 del siRNA debe ser preferiblemente una adenina o uracilo. (ii) La región semilla (nucleótidos 2 - 8) del siRNA debe ser rica en adeninas o uracilos presentando una Tm baja. (iii) La región central y parte de la región suplementaria deben ser ricas en guaninas o citosinas con una Tm alta. (iv) El extremo 3' del siRNA debe presentar un par de nucleótidos de DNA extra (Figura 23) (Kamola et al., 2015, Alagia and Eritja, 2016). Todos los siRNAs fueron sintetizados por Ambion. Para el diseño del siRNA RIG-I/VRSH-N, se empleó el software informático LALING (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/lalign/nucleotide.html> - European Bioinformatic Institute), por medio del cual se alinearon las secuencias del genoma del VRSH (polaridad positiva), y el mRNA que codifica para RIG-I. Como resultado del alineamiento, se encontró una región de 21 nucleótidos entre los dos mRNAs con alta homología de secuencia, a partir de la cual se diseñó el siRNA frente a ambos genes (RIG-I/VRSH-N) (Tabla 1). El siRNA frente al mRNA de la nucleoproteína del VRSH (ID # ADMSGPQ) está basado en la secuencia previamente publicada para el siRNA ALN-RSV01 (Alvarez et al., 2009) (Tabla 1) y fue mandado a sintetizar también por Ambion. El resto de los siRNAs son comerciales y se compraron a Ambion (Tabla 1).

2.7. Ensayos de silenciamiento

El silenciamiento de la expresión de genes se llevó a cabo en células A549 sembradas a una densidad de $4,5 \times 10^4$ células por pocillo en placas M24 con 24 horas de antelación. Para cada pocillo se prepararon dos tubos: uno con 6 o 12 pmoles del siRNA (Tabla 1) en 50 μ l de medio Optimem (Gibco), y otro con 1 μ l de Lipofectamina RNAiMax (Invitrogen) en 50 μ l de Optimem. Ambos tubos se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se mezcló su contenido y se incubaron durante otros 20 minutos también a temperatura ambiente. Una vez finalizada la incubación, se añadieron 100 μ l de la mezcla a cada pocillo sobre el medio de cultivo (DMEM10 sin antibiótico) y las células se incubaron a 37°C. Pasadas 24 horas de la transfección, las células fueron lavadas con medio DMEM2 sin antibiótico para infectarlas con el VRSH a una MOI de 0,1 o 3 PFU por célula. La recogida de las muestras se realizó a diferentes tiempos post-infección

almacenando el sobrenadante de cultivo para la titulación del virus, y el sedimento celular para extraer RNA o proteína.

2.8. Ensayos de sobreexpresión

La sobreexpresión de genes también se llevó a cabo en células A549 pero en placas M12 a una densidad de $1,6 \times 10^5$ células por pocillo sembradas 24 horas antes. Para la transfección con los plásmidos se prepararon dos tubos para cada pocillo: uno con 3 μ l de Lipofectamina 3000 (Invitrogen) en 50 μ l de Optimem y otro con 1 μ g de plásmido junto a 1,5 μ l de P3000 en 50 μ l de Optimem. Tras 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, se añadió el contenido del primer tubo sobre el segundo y se incubó la mezcla durante 20 minutos. Posteriormente, se añadieron 100 μ l de la mezcla a cada pocillo y las células se incubaron a 37°C. Aproximadamente 24 horas después, se lavaron las células con DMEM2 sin antibiótico y se infectaron con el VRSV a una multiplicidad de infección de 3 PFU/célula. Tras 90 minutos de adsorción, se añadió medio a las células y se incubaron a 37°C hasta la recogida de las muestras a los diferentes tiempos post-infección.

2.9. Generación de células “*knockout*” para A20

A partir de las células A549, se generaron líneas celulares “*knockout*” (KO) para el gen de *TNFAIP3* (A20) mediante la tecnología TALEN (Transfection Activator-like Effector Nuclease). Esta tecnología consiste en la expresión intracelular de nucleasas que reconocen y cortan secuencias específicas del gen diana (Kim et al., 2013b, Gonzalez-Sanz et al., 2016). En primer lugar, las células se transfectaron con los plásmidos comerciales H27583_TNFAIP3_TALEN-L y H27583_TNFAIP3_TALEN-R (TALEN Library Resource, Seoul National University), que codifican nucleasas frente a secuencias específicas del DNA de A20. Posteriormente las células se tripsinizaron y se clonaron en placas de 96 pocillos a una densidad de una célula por pocillo mediante dilución límite. Tras varios días en cultivo, se fueron seleccionando aquellos pocillos en los que solamente se detectó un único clon, y se fueron expandiendo a pocillos de mayor tamaño hasta conseguir material suficiente para poder analizarlos. Las líneas celulares seleccionadas y crecidas fueron analizadas por PCR con los oligonucleótidos TNFAIP3_TALEN_F1 y TNFAIP3_TALEN_R1 (Tabla 4) y un programa de 5 minutos a 94°C; 35 ciclos de 30

segundos a 94°C, 30 segundos a 64°C y un minuto a 72°C; y 7 minutos finales de extensión a 72°C. El producto de PCR fue posteriormente examinado en un gel de agarosa al 0,8% y las líneas celulares seleccionadas fueron secuenciadas y analizadas con el software Lasergene v7.2. Como análisis adicional, las líneas celulares KO obtenidas se analizaron también por western blot con un anticuerpo específico frente a TNFAIP3 (Tabla 5). Todas las líneas celulares seleccionadas en la primera ronda de clonación se sometieron a una segunda ronda y a una nueva confirmación mediante PCR, secuenciación y western blot. Fueron las líneas celulares resultantes de esta segunda ronda las que se expandieron y se almacenaron para ser utilizadas en los ensayos. Como control negativo, se seleccionó una línea celular A549 salvaje que fue sometida al mismo proceso de transfección y clonación que las líneas celulares KO.

2.10. Ensayos de viabilidad celular

Se llevó a cabo en las células A549 transfectadas con los siRNAs mediante un ensayo de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium). Las células A549 fueron sembradas a una densidad de 9×10^3 células por pocillo en placas M96. Veinticuatro horas más tarde, las células fueron transfectadas por quintuplicado con los diferentes siRNAs como se describe en el apartado “Ensayos de silenciamiento”. Una vez transfectadas, se añadieron 10 µl de MTT (5 mg/ml, Calbiochem) por pocillo a tiempos 0 y 72 horas post-transfección, y se incubaron a 37°C durante 4 horas. Pasado ese tiempo, se añadieron 120 µl de isopropanol con 0,04 N HCl por pocillo y las placas se pusieron 1 hora en agitación antes de medir la absorbancia (A) a 570 nm en un espectrofotómetro. La tasa de supervivencia (SR, survival rate), fue medida como: $SR = (A \text{ tratadas} / A \text{ control}) \times 100$.

2.11. Ensayos de apoptosis

La apoptosis celular se cuantificó en células A549 transfectadas con los diferentes siRNAs e infectadas con el VRSH, y en las líneas celulares KO para A20 infectadas también con el VRSH. Los ensayos se realizaron por medio del kit comercial “Single Channel Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V-Alexa-fluor488TM and SytoxTM” (Cat. # V13240, Invitrogen), siguiendo el protocolo del fabricante. Los niveles de apoptosis fueron detectados por citometría de flujo en un citómetro BD

FACSCanto™ Flow Cytometer (BD Biosciences) y los resultados fueron analizados con el software FlowJo™ (BD Biosciences).

2.12. Preparación de librerías de mRNA-seq y secuenciación

El RNA total se extrajo de las células infectadas por medio del kit comercial ReliaPrep RNA Cell Miniprep System descrito anteriormente. El RNA fue cuantificado en un espectrofotómetro “BioPhotometer Plus” y su calidad fue evaluada en el equipo 2100 Bioanalyzer RNA NANO assay (Agilent technologies). Todas las muestras tuvieron un número de integridad del RNA (RIN, RNA, integrity number) superior a nueve. Las librerías se prepararon mediante el kit comercial “TruSeq Stranded mRNA Sample Prep Kit v2” (ref. RS-122-2101/2, Illumina), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se emplearon 500 ng de RNA total para capturar el RNA con colas de poliA (poliA+) por medio de un Oligo (dT) unido a bolas magnéticas. El RNA poliA+ capturado fue fragmentado con cationes divalentes a baja temperatura. Los RNAs fragmentados, con 300 pb de media, se copiaron a cDNA mediante transcripción inversa (“SuperScript II”, ref. 18064-014, Invitrogen) empleando oligonucleótidos aleatorios. Para mantener la información de cadena, se sintetizó la segunda hebra del cDNA con una polimerasa I y la RNasa H sustituyendo los dTTPs por dUTPs. El DNA de doble cadena se adeniló en su extremo 3' y se ligó a los adaptadores “TruSeq Adapters” (Illumina) correspondientes, que son los índices que permiten identificar todas las secuencias que proceden de una misma muestra. Posteriormente los productos se purificaron con un sistema de bolas “AMPure XP Beads” (ref. A63881, Beckman Coulter). El enriquecimiento de la librería se realizó por PCR.

Las librerías finales fueron analizadas por medio de “Agilent DNA 1000 chip” para estimar la cantidad y distribución de tamaños de los fragmentos insertados, y fueron posteriormente cuantificadas por qPCR con el kit “KAPA Library Quantification Kit” (ref. KK4835, KapaBiosystems), antes de ser amplificadas en el equipo “Illumina’s cBot” (Illumina) para la generación de los “clusters”. Por último, las librerías fueron secuenciadas utilizando una longitud de lectura de más de 50 nucleótidos en un solo sentido (1 x 50) en el equipo “Illumina’s HiSeq 2500” (Illumina).

2.13. Análisis de datos

Los datos obtenidos del RNAseq fueron analizados con ayuda del servicio de Bioinformática del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). En primer lugar se llevó a cabo el análisis del control de calidad por medio del programa FastQC (v0.11.3) (Institute, 2012). Posteriormente se eliminaron tanto las secuencias de los adaptadores como las secuencias con baja calidad con el programa Trimmomatic v0.36 (Bolger et al., 2014). Se realizó una evaluación exhaustiva de la calidad de la secuencia desde los extremos 5' al 3', eliminando las bases con una calidad media inferior a un score de Qphred de 15 (15Q). Se eliminaron las lecturas de menos de 50 nucleótidos de longitud. Las lecturas fueron mapeadas frente al genoma humano Hg38 con el programa Tophat (v2.0.14) (Kim et al., 2013a, Trapnell et al., 2012) y el control de la calidad del mapeado se llevó a cabo mediante RsecQC (v2.6.4) (Wang et al., 2012, Goff, 2013).

Para el análisis de la expresión de los transcritos, se transformó el número de secuencias contabilizadas en cada transcrito en “*counts*”, utilizando el programa informático Cufflinks (v2.2.1) basado en los genes de referencia definidos en la secuencia Ref-Seq (Hg38) y que contiene el fichero gtf (Roberts et al., 2011, Anders and Huber, 2010). Por último, el análisis de la expresión diferencial de genes se llevó a cabo usando “*cuffdiff*”, el cual utiliza la corrección de Benjamini-Hochberg para calcular el valor FDR (q-value). Los genes con valores de $FDR \leq 0.05$ se consideraron que estaban diferencialmente expresados. El programa informático CummeRbund (v2.14.0) fue utilizado para el control de calidad y visualización de los resultados.

2.14. Anotación funcional de los genes seleccionados

La anotación funcional de los genes seleccionados ($FC \geq 1.5$ y $FDR \leq 0.05$) se realizó mediante la herramienta bioinformática DAVID 6.8 (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) (<https://david.ncifcrf.gov/>) (Huang da et al., 2009a, Huang da et al., 2009b). Del programa se extrajo información de los procesos biológicos (Gene Ontology Biological Processes) y las rutas de señalización (KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (Kanehisa and Goto, 2000, Du et al., 2014), en las que está implicado cada gen,

aplicando un score EASE de 0.1 y seleccionando las rutas en las que participan al menos 2 de los genes de la lista (Count = 2)

2.15. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos para determinar las diferencias significativas entre las distintas condiciones experimentales se realizó mediante la prueba t de Student. Se consideraron significativos aquellos valores de p menores de 0.05. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el programa informático GraphPad Prism 8.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Respuesta celular a la infección por el VRSH: Señalización vía RIG-I

1.1. La activación de RIG-I es esencial para desencadenar la respuesta inmune innata en células infectadas por el VRSH

RIG-I es el principal receptor celular que se activa por la infección con el VRSH en células epiteliales respiratorias (Liu et al., 2007). Para confirmar que RIG-I tiene un papel esencial en la respuesta inmune innata inducida por el VRSH en nuestro modelo de infección, se silenció la expresión de *RIG-I* en células A549 mediante un siRNA específico (Tabla 1) y 24 horas más tarde se infectaron las células con el VRSH a una MOI (Multiplicity of Infection) de 3. El sobrenadante de cultivo y las células se recogieron a 24 y 48 horas post-infección (hpi). Los niveles de expresión de RIG-I en las células silenciadas fueron cuantificados con respecto a los niveles de expresión obtenidos en las células transfectadas con un siRNA control (Anexo I, Figura 1).

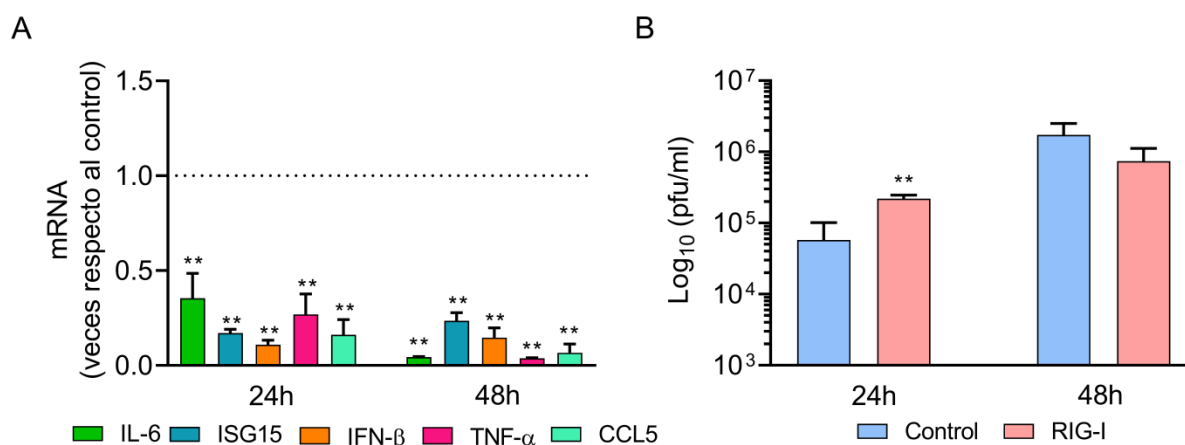


Figura 9: Expresión de genes de respuesta inmune innata y producción de virus en células silenciadas para *RIG-I*. (A) Cuantificación de los niveles de mRNA de varios genes de respuesta inmune inflamatoria/antiviral por q-PCR en células transfectadas con un siRNA frente al mRNA de *RIG-I* e infectadas con el VRSH. Los resultados que se muestran son los valores obtenidos en las células silenciadas con respecto a células transfectadas con un siRNA control (B) Título viral de los sobrenadantes de cultivo recogidos a 24 y 48 hpi con el VRSH en células A549 transfectadas con un siRNA control y el específico para *RIG-I*. Los datos representan la media y desviación estándar de al menos tres ensayos independientes. Las comparaciones entre los grupos fueron realizadas por medio de un *t*-test. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

Se analizaron los niveles de expresión de *IL6*, *ISG15*, *IFN- β* , *TNF- α* y *CCL5* mediante la cuantificación de su mRNA en las células silenciadas y se comparó con los niveles de expresión en células transfectadas con un siRNA control (Figura 9A). Los resultados mostraron un descenso significativo generalizado de la expresión de todos los genes analizados a 24 y 48 hpi (Figura 9A). Estos datos confirmaron el papel clave de RIG-I en la activación de la cascada de señalización intracelular y la expresión de genes de respuesta inmune innata en las células infectadas por el VRSH.

Se cuantificaron también los títulos virales para analizar el efecto del silenciamiento de la expresión de *RIG-I* sobre la producción de virus. Se titularon los sobrenadantes de las células transfectadas con el siRNA RIG-I e infectadas con el VRSH a una MOI de 3, a 24 y 48 hpi. Se observó un aumento significativo en el título viral de las células transfectadas con el siRNA RIG-I a 24 hpi al compararlo con los valores obtenidos de las células transfectadas con un siRNA control (Figura 9B). Sin embargo, a 48 hpi el título del virus en las células transfectadas con el siRNA RIG-I no presentó diferencias significativas con respecto al título viral de las células transfectadas con un siRNA control (Figura 9B).

1.2. Los silenciamientos de TRAF3 o TRAF6, dos adaptadores de la ruta de RIG-I, también reducen la respuesta inmune celular a la infección por el VRSH

La activación de RIG-I da lugar, a su vez, a la activación de una cascada de señalización intracelular en la que participan múltiples proteínas, entre ellas los adaptadores TRAF3 y TRAF6 (Figura 5) (Takeuchi and Akira, 2010). Para confirmar que estas rutas se activan en la infección por el VRSH se inhibió su expresión mediante siRNAs específicos frente al mRNA de TRAF3, TRAF6 y RIPK2 (Tabla 1). Las células transfectadas con los siRNAs mencionados, se infectaron 24 horas más tarde con el VRSH a una MOI de 3 y los niveles de expresión de cada uno de los genes silenciados fueron cuantificados con respecto a las células control (Anexo I, Figura 1). Tanto las células como los sobrenadantes de cultivo se recogieron a 24 y 48 hpi.

Los resultados del silenciamiento de TRAF3 o TRAF6 fueron similares para ambos adaptadores. En ambos casos se observó un descenso significativo de la expresión de todos los genes analizados a 24 hpi, salvo para *IL-6* en las células silenciadas para TRAF3 (Figura 10A). A tiempos tardíos, únicamente se observa un descenso en los niveles de expresión de *TNF- α* y de *IL-6*, aunque este último solo en las células transfectadas con el siRNA TRAF6 (Figura 10A). Se silenció también la expresión de RIPK2, un adaptador activado por NLRs. En este caso no se observaron diferencias en los niveles de respuesta inmune (Figura 10A), indicando que esta ruta no se activa en la infección de células epiteliales por el VRSH.

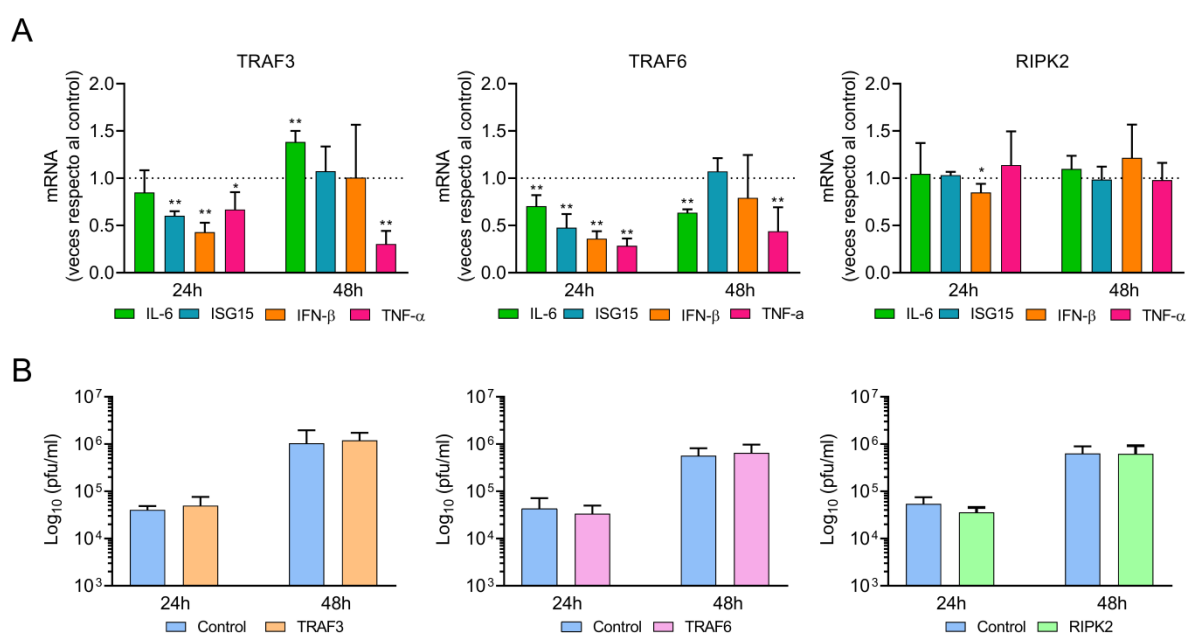


Figura 10: Efecto del silenciamiento de la expresión de *TRAF3*, *TRAF6* y *RIPK2* en la expresión de genes de respuesta inmune innata y la producción de virus infeccioso. (A) Cuantificación del mRNA de varios genes de respuesta inmune inflamatoria y antiviral en las células transfectadas e infectadas con el VRSH. Los resultados que se muestran son los valores obtenidos en las células silenciadas con los correspondientes siRNAs, con respecto a las células silenciadas con un siRNA control. (B) Título viral de los sobrenadantes de cultivo recogidos a 24 y 48 hpi con el VRSH en células A549 transfectadas con un siRNA control y los siRNAs específicos para cada gen. Los datos representan la media y desviación estándar de al menos tres ensayos independientes. Las comparaciones entre los grupos fueron realizadas por medio de un *t*-test. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

Al analizar la replicación del virus en las células silenciadas para TRAF3 o TRAF6, no se observaron diferencias significativas con respecto a las células transfectadas con un siRNA control, ni a 24 ni a 48 hpi (Figura 10B).

En conjunto, estos resultados confirman que la ruta de señalización mediada por RIG-I es importante en la inducción de la respuesta inmune temprana frente al VRSH en las células epiteliales respiratorias A549.

1.3. Regulación de RIG-I por procesos de ubiquitinación y deubiquitinación

RIG-I está finamente regulado por procesos de ubiquitinación y deubiquitinación en los que participan una serie de proteínas con actividad ubiquitinasa/deubiquitinasa (Figura 7) (Gack et al., 2007, Oshiumi et al., 2009, Gao et al., 2009, Arimoto et al., 2007, Friedman et al., 2008). Tras demostrar que la ruta de RIG-I es esencial en la inducción de la respuesta inflamatoria y antiviral contra el VRSH, nos planteamos analizar el efecto del silenciamiento de diferentes ubiquitinastas/deubiquitinastas que regulan su actividad en las infecciones por el VRSH. Se transfectaron células A549 con siRNAs específicos frente a los genes *TRIM25*, *RNF135* (*RIPLET*), *RNF125* y *CYLD* (Tabla 1) y 24 horas más tarde se infectaron con el VRSH a una MOI de 3. Tanto los sobrenadantes de cultivo como las células fueron recogidos a 24 y 48 hpi. Los niveles de expresión de cada uno de los genes silenciados, fueron cuantificados con respecto a las células transfectadas con un siRNA control (Anexo I, Figura1).

Se analizó la expresión de genes de respuesta inmune inflamatoria y antiviral en las células silenciadas mediante la cuantificación de los mRNAs correspondientes. En las células transfectadas con el siRNA frente a *TRIM25*, un regulador positivo de RIG-I (Figura 7), no se observaron grandes diferencias en la expresión de los genes analizados, ni a 24 ni a 48 hpi, salvo un ligero aumento de *IL-6* e *ISG15* a 24 hpi en comparación con los datos obtenidos en las células transfectadas con un siRNA control (Figura 11A). Sin embargo, en las células transfectadas con el siRNA *RNF135* (*RIPLET*), que también es un regulador positivo de RIG-I (Figura 7), se observó un descenso significativo de la expresión de los genes analizados a las 48 hpi (Figura 11A).

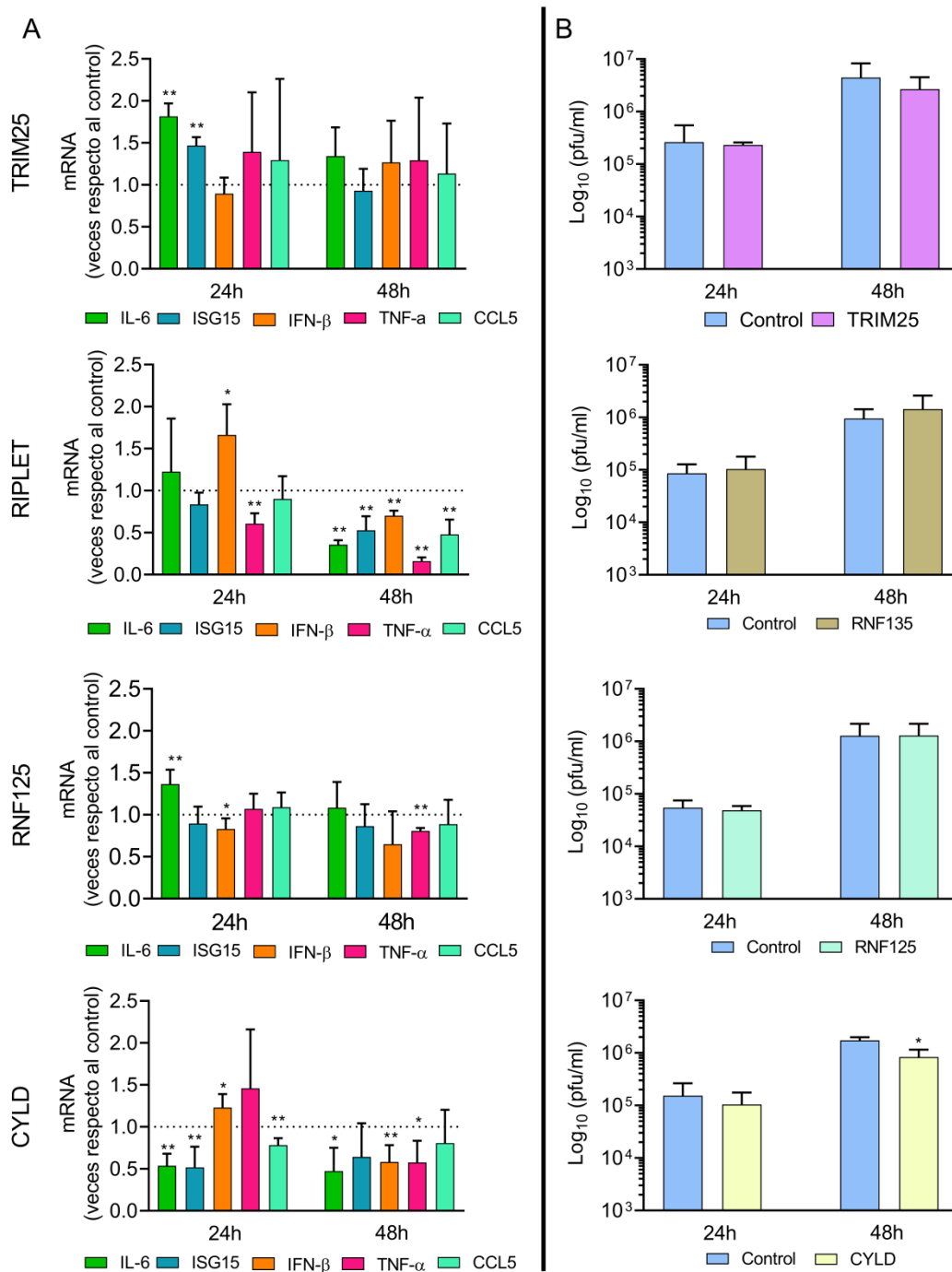


Figura 11: Silenciamiento de la expresión de *TRIM25*, *RNF135* (*RIplet*), *RNF125* y *CYLD*. (A) Cuantificación del mRNA de varios genes de respuesta inmune inflamatoria/antiviral por qPCR, de las células transfectadas con el correspondiente siRNA e infectadas con el VRSH. Los resultados que se muestran son los valores obtenidos en las células silenciadas con respecto a las células transfectadas con un siRNA control. (B) Título viral de los sobrenadantes recogidos a 24 y 48 hpi de las células A549 transfectadas con un siRNA control y el específico para cada gen. Los datos representan la media y desviación estándar de al menos tres ensayos independientes. Las comparaciones entre los grupos fueron realizadas por medio de un *t*-test. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

En cuanto a los reguladores negativos de RIG-I (Figura 7), en el silenciamiento de *RNF125* no se observó un patrón consistente en la expresión diferencial de genes. Así, aumentó ligeramente la expresión de *IL-6* a 24 hpi, mientras que disminuyó la de *IFN- β* a 24 hpi y *TNF- α* a 48 hpi. Por el contrario, en el silenciamiento de *CYLD* se observó un descenso significativo en los niveles de expresión de *IL-6*, *ISG15* y *CCL5* a 24 hpi y de *IL-6*, *IFN- β* y *TNF- α* a 48 hpi (Figura 11A). Este resultado obtenido con CYLD no es el esperado teniendo en cuenta su papel como regulador negativo de RIG-I. Sin embargo, este resultado podría explicarse teniendo en cuenta otros procesos en los que interviene CYLD y que serán discutidos más adelante.

Al realizar la titulación de los sobrenadantes de cultivo de cada una de las células transfectadas con los siRNAs seleccionados, los resultados obtenidos en todos los casos fueron similares. No se observaron diferencias significativas en la replicación del virus ni a 24 ni a 48 hpi en ningún caso salvo para las células transfectadas con el siRNA CYLD. En este caso, se obtuvo un descenso significativo de la replicación viral al compararlo con los datos obtenidos de células transfectadas con un siRNA control a 48 hpi (Figura 11B).

2. Papel de A20 en la infección por el VRSH

A20 es un regulador negativo de los factores de transcripción NF- κ B e IRF3/7, siendo clave en la modulación de varias cascadas de señalización intracelular, incluida la activada por RIG-I, que dan lugar a la respuesta inflamatoria/antiviral (Figura 5) (Catrysse et al., 2014). Por ello, se decidió estudiar el papel de A20 en la infección por el VRSH.

2.1. La infección por el VRSH aumenta los niveles de expresión de A20

En primer lugar, se realizó una cinética de expresión de A20 en las células A549 infectadas con el VRSH. Para ello se infectaron las células con el virus a una MOI de 3 y se recogieron las células a diferentes tiempos post-infección (0, 3, 6, 16, 24, 36 y 48 hpi).

Por un lado, se cuantificaron los niveles de expresión del mRNA de A20 por qPCR en las células infectadas con respecto a las células no infectadas. Como control de la progresión de la infección se cuantificó el RNA total de la

nucleoproteína (N) del virus. Se observó que la expresión de *A20* está retrasada en el tiempo con respecto a los niveles de expresión de la nucleoproteína del virus (Figura 12A). El aumento en la expresión de *A20* comienza a observarse de forma clara a partir de las 24 hpi y alcanza niveles de hasta 500 veces a 48 hpi con respecto a las células no infectadas (Figura 12A).

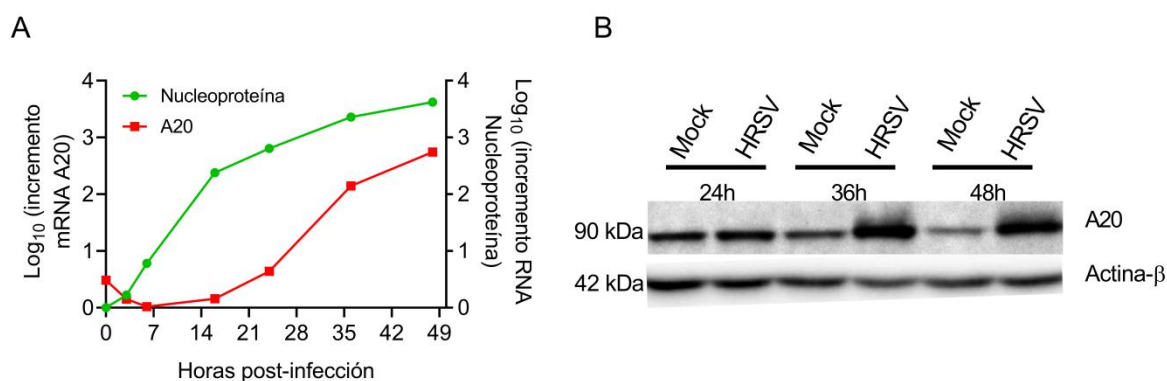


Figura 12: Cinética de expresión de *A20* en células A549 infectadas con el VRSH a una MOI de 3. (A) Niveles de expresión del mRNA de *A20* y del RNA de la nucleoproteína obtenidos a cada tiempo por triplicado. Los datos representan, en cada uno de los tiempos analizados, el número de veces de incremento en la cantidad de mRNA de *A20* con respecto a células no infectadas, y de la nucleoproteína viral respecto al tiempo cero de infección. (B) Niveles de expresión de la proteína *A20* a 24, 36 y 48 hpi. Como control interno, se cuantifican los niveles de expresión de la actina-β celular.

Por otro lado, se cuantificaron por western blot los niveles de expresión de la proteína *A20* en las células infectadas con el VRSH. Los resultados se compararon con la expresión de *A20* en células no infectadas (Mock). De nuevo se observó que la expresión de *A20* comienza a aumentar de forma significativa a partir de las 24 hpi (Figura 12B).

2.2. El silenciamiento de *A20*, *TAX1BP1* o *ABIN1* incrementa la respuesta inmune innata y disminuye la producción de virus

En determinados casos, para realizar su función, *A20* tiene que interaccionar con otras proteínas (*TAX1BP1*, *ABIN1*, *ITCH* y *RNF11*) formando complejos que modulan su actividad y la especificidad de sustrato. Para caracterizar el papel de *A20* y de algunas de las proteínas que interaccionan con ella en las infecciones por el VRSH, se inhibió su expresión mediante siRNAs específicos frente al gen de *A20*, *TAX1BP1*, *ABIN1*, *ITCH* o *RNF11* (Tabla 1) y 24 horas más tarde se infectaron esas

mismas células con el VRSH a una MOI de 3. Los sobrenadantes de cultivo y las células se recogieron a 24 y 48 hpi. El silenciamiento de los genes se confirmó por qPCR con respecto a las células transfectadas con un siRNA control (Anexo I, Figura 2).

A tiempos tempranos de la infección (24 hpi), se observó un incremento generalizado en los niveles de expresión de los genes *IL-6*, *ISG15*, *IFN- β* , *TNF- α* e *IL-1 β* en las células silenciadas para *A20*, *TAX1BP1* y *ABIN1* con respecto a células transfectadas con un siRNA control (Figura 13). Sin embargo, solamente los niveles de expresión de *ISG15* y *TNF- α* incrementaron en las células transfectadas con el siRNA frente a *ITCH*, y ninguno de los genes analizados mostró un incremento de su expresión en las células silenciadas para *RNF11* (Figura 13). A tiempos tardíos post-infección (48 hpi), en general, los niveles de expresión de estos genes involucrados en la respuesta inmune inflamatoria/antiviral bajan con respecto a las 24 hpi, llegando algunos a mostrar diferencias significativas con respecto a las células transfectadas con un siRNA control (Figura 13).

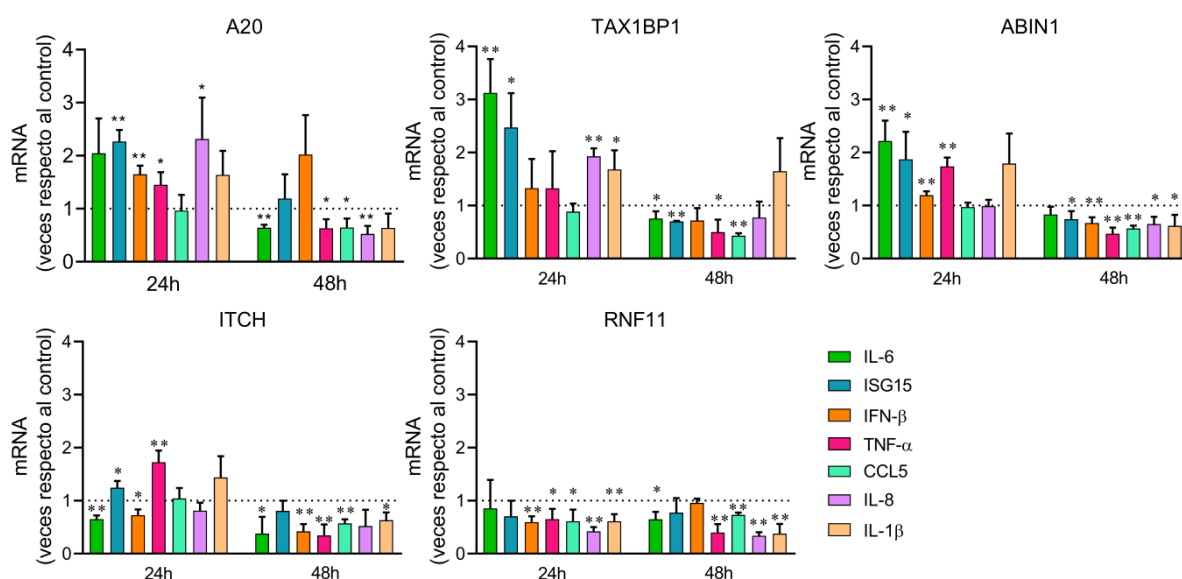


Figura 13: Niveles de expresión de genes de respuesta inmune inflamatoria/antiviral en células transfectadas con siRNAs frente a *A20*, *TAX1BP1*, *ABIN1*, *ITCH* o *RNF11* e infectadas 24 h más tarde con el VRSH a una MOI de 3. Se cuantificaron los niveles de expresión de estos genes a partir del mRNA correspondiente por qPCR. Los resultados que se muestran son los valores obtenidos en las células silenciadas con respecto a las células transfectadas con un siRNA control. Los datos representan la media y desviación estándar de al menos tres ensayos independientes. Las comparaciones entre los grupos fueron realizadas por medio de un *t*-test. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

Estas diferencias en la expresión de genes a 24 y 48 hpi podrían deberse a otros procesos en los que interviene A20 dentro de las cascadas de señalización, y que serán discutidos más adelante.

Para analizar si la inhibición en los niveles de expresión de A20 y de las proteínas que interaccionan con ella tiene algún impacto sobre la replicación del virus, se cuantificó la producción de virus infeccioso en los sobrenadantes de cultivo recogidos a 24 y 48 hpi de las células transfectadas con los siRNAs específicos para cada gen. Se observó un descenso significativo del título viral en las células transfectadas con todos los siRNAs a 48 hpi con respecto al control, salvo para *RNF11*, que también mostró un descenso en los niveles del título del virus, pero sin llegar a ser significativo (Figura 14).

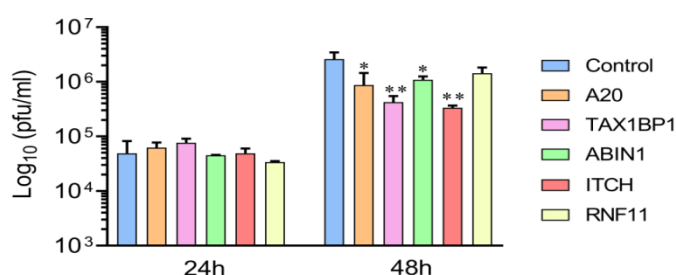


Figura 14: Título viral de los sobrenadantes de cultivo recogidos a 24 y 48 hpi con el VRSH en células A549 transfectadas con un siRNA control y el específico para cada gen: *A20*, *TAX1BP1*, *ABIN1*, *ITCH* y *RNF11*. Los datos representan la media y desviación estándar de al menos tres ensayos independientes. Las comparaciones entre los grupos fueron realizadas por medio de un *t*-test. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

2.3. La producción del VRSH disminuye en células “*knockout*” para A20 mientras que la respuesta antiviral e inflamatoria aumenta en estas células

Los datos obtenidos a partir de los silenciamientos de A20, y de las proteínas que interaccionan con ella, muestran un claro efecto de estas proteínas en la regulación de la respuesta inmune innata temprana desencadenada por el VRSH. Para confirmar estos datos, se llevaron a cabo ensayos similares en células A549 “*knockout*” (KO) para A20. Se generaron dos líneas celulares que no expresan la proteína A20 (KO-1 y KO-2), mediante la tecnología de nucleasas TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease). Al mismo tiempo se obtuvo también una línea celular silvestre (WT) que pasó por el mismo proceso de transfección y

selección que las células KO. La falta de expresión de A20 en las líneas celulares KO se comprobó mediante western blot (Figura 15).

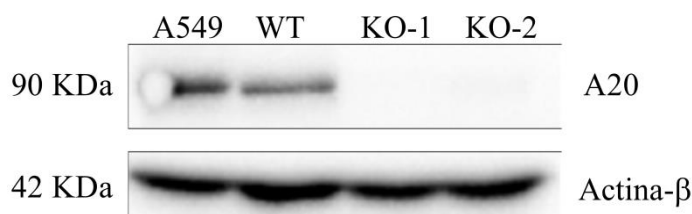


Figura 15: Niveles de expresión de la proteína A20 en células infectadas con el VRSH a una MOI de 3. Los extractos fueron recogidos a 48 hpi. Como control interno, se muestran los niveles de expresión de la actina-β celular.

Las dos líneas celulares KO, la línea celular WT, y las células A549 parentales fueron infectadas con el VRSH a una MOI de 3 y tanto los sobrenadantes de cultivo como las células se recogieron a 24 y 48 hpi. Se analizaron los niveles de expresión de los genes de respuesta inmune innata mediante la cuantificación de los mRNA por qPCR.

Al igual que se observa en las células silenciadas para A20, los niveles de expresión de la mayoría de los genes de respuesta inmune inflamatoria/antiviral aumentan significativamente en las líneas celulares KO para A20 a 24 hpi (Figura 16). Solamente la expresión de IL-1β se vio inhibida en la línea celular KO-2 en comparación con las células A549 parentales a este tiempo. Por el contrario, a las 48 hpi, la mayoría de los genes no solo no mostraron un aumento de expresión, sino que incluso la expresión de alguno de ellos disminuyó con respecto a las células A549 parentales, de forma similar a lo observado en los ensayos de silenciamiento (Figura 16). Solamente la expresión de *IL-6* e *IL-8* aumentó significativamente a las 48 hpi y solo en la línea celular KO-2.

Al contrario de lo que sucede en las líneas celulares KO, la línea celular WT mostró un descenso en la expresión de genes de respuesta inmune innata a 24 hpi, y una expresión variable a 48 hpi (Figura 16).

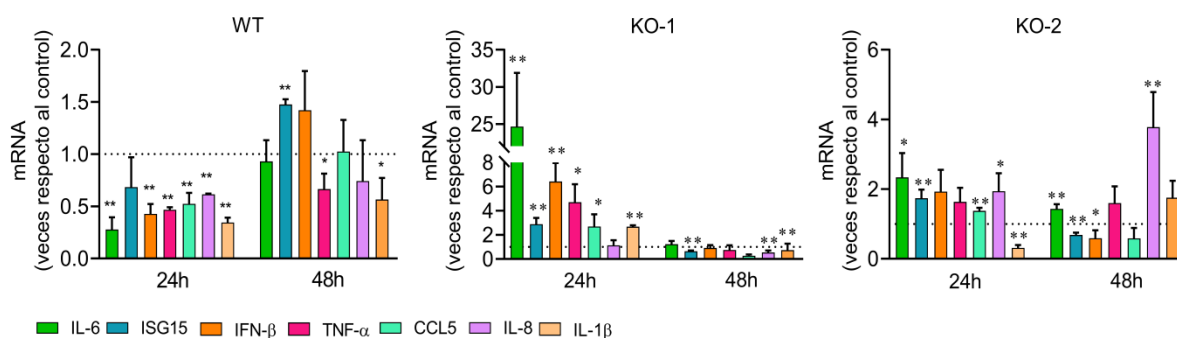


Figura 16: Expresión de genes de respuesta inmune inflamatoria/antiviral en las líneas celulares KO para A20. Se cuantificaron los niveles de mRNA de varios de estos genes por qPCR en células infectadas con el VRSH (WT, KO-1, KO-2). Los resultados que se muestran son los valores obtenidos con respecto a las células A549 parentales. Los datos representan la media y desviación estándar de al menos tres ensayos independientes. Las comparaciones entre los grupos fueron realizadas por medio de un *t*-test. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

Para confirmar y ampliar los resultados obtenidos por qPCR, las células KO y parentales se infectaron a una MOI de 3, se extrajo el RNA total a 24 hpi y se cuantificó la expresión de los genes celulares mediante secuenciación masiva de los mRNAs. Se analizaron los datos de tres experimentos independientes, de los que se obtuvieron dos listados de genes sobreexpresados ($FC \geq 1.5$, $q \leq 0.05$), derivados de la comparación de cada una de las dos líneas celulares KO con la parental. A partir de estos listados se seleccionaron los genes que resultaron sobreexpresados en ambas líneas KO. Posteriormente se realizó un análisis funcional de estos genes mediante la herramienta informática DAVID 6.8. Al comparar las dos líneas celulares KO con las células A549 parentales, se observó un aumento en los niveles de expresión de genes implicados en procesos biológicos (GO-BP, Gene Ontology Biological Processes) relacionados con la respuesta inmune (Tabla 6). De forma similar, las rutas (KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) relacionadas con respuesta inmune y respuesta antimicrobiana también se vieron enriquecidas en ambas líneas celulares KO (Tabla 7).

Proceso Biológico	Símbolo del gen	Benjamini (p-value)
GO:0006955 Respuesta inmune	CCL26, CXCL2, CXCL5, CXCL8, CD70, CD74, SAMHD1, TNFRSF1B, TNFRSF21, B2M, CTSS, CIITA, C1R, C3, GBP2, IFITM2, IL1RAP, IL7R, HLA-C, PDCD1LG2, TLR4, TRIM22, TNFSF10, TNFSF13B, TNFSF14, TNFSF9	0.017
GO:0001666 Respuesta a hipoxia	CD24, CD38, CASP1, DPP4, EGLN1, EDNRA, HIF1A, LOXL2, MMP2, MUC1, PLAT, PLOD2, SLC2A8, SOD2, TGFBR2	0.031
GO:0051607 Respuesta de defensa frente virus	MX2, SAMHD1, APOBEC3G, GBP1, GBP3, IFI16, IFI44L, IFIT1, IFITM1, IFITM2, IL33, SERINC5, TLR3, TRIM22	0.055
GO:0006954 Respuesta inflamatoria	CCL17, CCL26, CXCL2, CXCL5, CXCL8, SMAD1, TNFRSF1B, TNFRSF21, AOX1, CHST2, CASP4, CIITA, C3, ITGB2, IFI16, IL1RAP, NR1H4, PTX3, RPS6KA5, THEMIS2, TLR3, TLR4	0.06
GO:0060333 Cascada de señalización mediada por interferón-gamma	IFI30, B2M, CIITA, GBP1, GBP2, IFNGR1, HLA-C, MT2A, TRIM22	0.069
GO:0007155 Adhesión celular	ADAM12, CD24, EDIL3, EPHA4, KIAA1462, KITLG, CDH2, CDH6, CEACAM1, COL4A6, COL5A1, EFNB2, FAP, FN1, LGALS3BP, ISLR, IGFBP7, ITGB2, LSAMP, LOXL2, RGMB, SCN1B, TNC, THEMIS2	0.084
GO:0060337 Cascada de señalización de IFN-I	MX2, SAMHD1, XAF1, GBP2, IFIT1, IFITM1, IFITM2, HLA-C	0.15
GO:0002237 Respuesta a moléculas de origen bacteriano	CXCL2, CXCL8, CD24, MALT1	0.20
GO:0045766 Regulación positiva de angiogenesis	CXCL8, GATA2, GATA6, WNT5A, CCB1, C3, HIF1A, ITGB2, TGFBR2, TWIST1	0.22
GO: 0040037 Regulación negativa de crecimiento de fibroblastos	WNT4, WNT5A, SPRY1, SULF2	0.22

Tabla 6: Procesos biológicos enriquecidos en los genes que están sobreexpresados simultáneamente en las dos líneas celulares KO infectadas con el VRSH. Se representan los diez procesos biológicos más relevantes.

Ruta afectada	Símbolo del gen	Benjamini (p-value)
hsa04060 Interacción receptor citoquina-citoquina	CCL17, CCL26, CXCL2, CXCL5, CXCL8, CD70, TNFRSF19, TNFRSF1B, TNFRSF21, IFNGR1, IL1RAP, IL7R, LIFR, TGFBR2, TNFSF10, TNFSF13B, TNFSF14, TNFSF9	0.015
hsa05133 Pertussis	CXCL5, CXCL8, CASP1, C1R, C1S, C3, C4BPA, ITGB2, TLR4	0.041
hsa05134 Legionelosis	CXCL2, CXCL8, CASP1, C3, EEF1A2, ITGB2, TLR4	0.11
hsa00760 Metabolismo nicotinato y nicotinamida	NT5C3A, CD38, AOX1, NNMT, NNT	0.21
hsa04610 Cascada de coagulación y complemento	C1R, C1S, C3, C4BPA, CFB, CFI, PLAT	0.22
hsa05150 Infección Staphylococcus aureus	C1R, C1S, C3, CFB, CFI, ITGB2	0.27
hsa05152 Tuberculosis	CD74, MALT1, CTSS, CIITA, C3, EEA1, ITGB2, IFNGR1, TLR4, VDR	0.55
hsa04145 Fagosoma	CTSS, C1R, C3, EEA1, ITGB2, HLA-C, TLR4, TUBA1A, TUBB3	0.51
hsa04612 Presentación y procesamiento de antígenos	CD74, IFI30, B2M, CTSS, CIITA, HLA-C	0.55
hsa05146 Amoebiasis	CXCL8, COL4A5, COL4A6, COL5A1, FN1, ITGB2, TLR4	0.58

Tabla 7: Rutas celulares enriquecidas en los genes que se encuentran sobreexpresados simultáneamente en las dos líneas celulares KO infectadas con el VRSH. Se representan las diez rutas celulares más relevantes.

Al seleccionar los genes cuyos niveles de expresión se encontraron disminuidos con respecto a las células A549 parentales ($FC \leq 1.5$, $q \leq 0.05$), no se encontraron procesos biológicos ni rutas celulares que fueran estadísticamente significativas.

Con el fin de comprobar si la producción de VRSH se ve alterada en las células KO, como ocurre en las células silenciadas para A20 (Figura 14), se analizó la replicación viral en ellas y se comparó con las células A549 parentales. Se recogieron los sobrenadantes de cultivo de las células infectadas a 24 y 48 hpi y se cuantificó el virus por un ensayo de formación de placas. Se observó un descenso significativo en los niveles de replicación del virus en las dos líneas celulares KO para A20 en comparación con la línea celular WT a 48 hpi (Figura 17). A este tiempo también se observó un descenso del título viral en las células KO con respecto a las células A549 parentales, aunque en este caso no fue estadísticamente significativo. A 24 hpi el único descenso en la producción de virus que se observó fue en la línea KO-2 con respecto a las células A549 parentales.

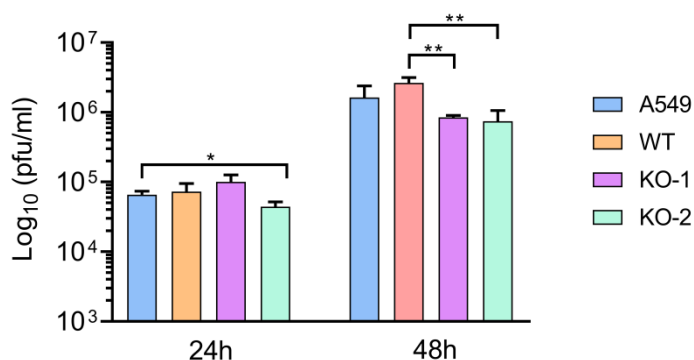


Figura 17: Título viral de los sobrenadantes recogidos en la infección de las líneas celulares KO para A20 a 24 y 48 hpi con el VRSH. Se analizan los sobrenadantes de las células A549 parentales, una línea celular WT y dos líneas celulares KO para A20. Los datos representan la media y desviación estándar de al menos tres ensayos independientes. Las comparaciones entre los grupos fueron realizadas por medio de un *t*-test. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

En resumen, los resultados obtenidos en las líneas celulares KO coinciden, de forma general, con los resultados obtenidos durante el silenciamiento de la expresión de A20.

2.4. A20 tiene un efecto anti-apoptótico en células infectadas con el VRSH

Tanto A20, como algunas de las proteínas que interaccionan con ella, están también implicadas en procesos de apoptosis (Catrysse et al., 2014, De Valck et al.,

1999, Choi et al., 2017, Verstrepen et al., 2011, Oshima et al., 2009). Además, estudios previos han mostrado que la infección por VRSH induce apoptosis celular a tiempos tardíos post-infección (Monick et al., 2005, O'donnell et al., 1999), por lo que se decidió analizar los niveles de apoptosis, tanto en las células silenciadas con los siRNAs específicos frente al mRNA de *A20* y al mRNA de las proteínas que interaccionan con ella, como en las líneas celulares KO.

Para los ensayos de silenciamiento, se transfectaron las células A549 con los siRNA específicos para cada gen (*A20*, *TAX1BP1*, *ABIN1*, *ITCH* y *RNF11*) y se infectaron 24 horas más tarde con el VRSH a una MOI de 3. En el caso de las líneas celulares KO para *A20*, directamente se infectaron las dos líneas KO, la línea WT y las células A549 parentales, con el VRSH a una MOI de 3. En ambos casos, las células se recogieron a 48 hpi y se cuantificaron los niveles de apoptosis por citometría de flujo.

Se observó que en las células transfectadas con los siRNAs frente a *A20*, *TAX1BP1*, *ABIN1* o *ITCH*, los niveles de apoptosis aumentaron significativamente, al compararlos con los niveles de apoptosis obtenidos en las células transfectadas con un siRNA control (Figura 18). Por el contrario, en las células transfectadas con el siRNA *RNF11*, los niveles de apoptosis bajan con respecto a las células transfectadas con un siRNA control (Figura 18).

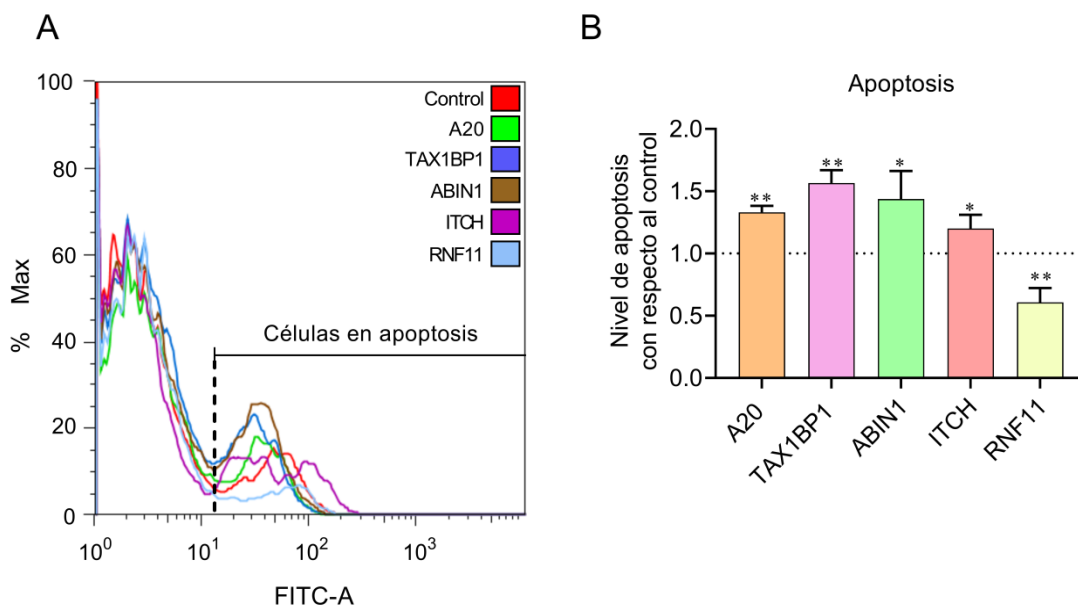


Figura 18: Niveles de apoptosis en células transfectadas con los siRNAs frente al mRNA de A20 y al mRNA de las proteínas que interactúan con ella (*TAX1BP1*, *ABIN1*, *ITCH* y *RNF11*) e infectadas 24 horas más tarde a una MOI de 3 con el VRSH. Las células se recogieron a 48 hpi y los niveles de apoptosis se cuantificaron por citometría de flujo. (A) Resultados de un ensayo representativo. (B) Cuantificación relativa de los niveles de apoptosis en las células transfectadas con los diferentes siRNAs (A20, *TAX1BP1*, *ABIN1*, *ITCH*, *RNF11*) con respecto a los niveles de apoptosis medidos en células transfectadas con un siRNA control. Los datos representan la media y desviación estándar de al menos tres ensayos independientes. Las comparaciones entre los grupos fueron realizadas por medio de un *t*-test. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

Del mismo modo se analizaron los niveles de apoptosis en las células KO infectadas y se compararon con las células A549 parentales (Figura 19). Se observó un aumento de dichos niveles en la línea celular KO-1. Sin embargo, ni la línea celular KO-2 ni la WT mostraron diferencias en los niveles de apoptosis con respecto a las células A549 parentales (Figura 19).

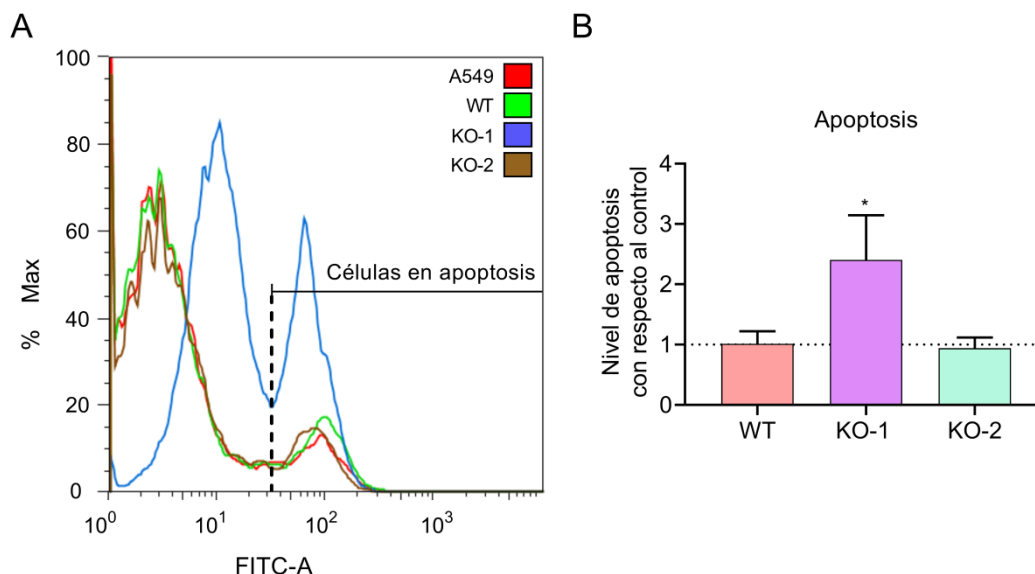


Figura 19: Niveles de apoptosis en las distintas células infectadas con el VRSH (MOI 3). Las células se recogieron a 48 hpi y los niveles de apoptosis se cuantificaron por citometría de flujo. (A) Resultados de un ensayo representativo. (B) Cuantificación relativa de los niveles de apoptosis en las distintas células infectadas (KO-1, KO-2 y WT) con respecto a los niveles de apoptosis medidos en las células A549 parentales infectadas. Los datos representan la media y desviación estándar de al menos tres ensayos independientes. Las comparaciones entre los grupos fueron realizadas por medio de un *t*-test. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

Los resultados, tanto del silenciamiento como los obtenidos con la línea KO-1, demuestran la importancia de la proteína A20, así como de algunas de las proteínas que interaccionan con ella, en la regulación de la apoptosis durante la infección por el VRSH. Sin embargo, los resultados obtenidos con la línea KO-2 no concuerdan con los anteriores, probablemente porque en esta línea mutante se ha podido compensar de alguna forma la ausencia de A20, como se discutirá más adelante.

2.5. Sobreexpresión de A20 en células A549 infectadas por VRSH

Tras analizar el efecto de la disminución de la expresión de A20 en la infección por el VRSH, nos propusimos realizar los experimentos inversos, es decir, aumentar los niveles de expresión de A20 mediante la transfección con plásmidos que codifican para esta proteína.

2.5.1. La sobreexpresión de A20 o TAX1BP1 de forma independiente no afecta a la respuesta inmune innata ni a la replicación del virus

Se transfectaron células A549 con plásmidos que expresan A20, TAX1BP1 o un plásmido control que no expresa ninguna proteína. Veinticuatro horas después, se infectaron las células con el VRSH a una MOI de 3 y los sobrenadantes de cultivo y las células se recogieron a 24 y 48 hpi. Los niveles de expresión de cada uno de esos genes fueron cuantificados con respecto a las células transfectadas con un siRNA control para determinar el nivel de silenciamiento (Anexo I, Figura 3).

Se analizaron los niveles de expresión de los genes de respuesta inmune inflamatoria/antiviral en las células transfectadas (Figura 20A). Al contrario de lo que sucede en los ensayos de silenciamiento, en general, no se observaron grandes diferencias en los niveles de expresión de los genes *IL-6*, *ISG15*, *IFN- β* , *TNF- α* , *CCL5*, *IL-8* e *IL-1 β* en ninguno de los dos tiempos analizados (Figura 20A).

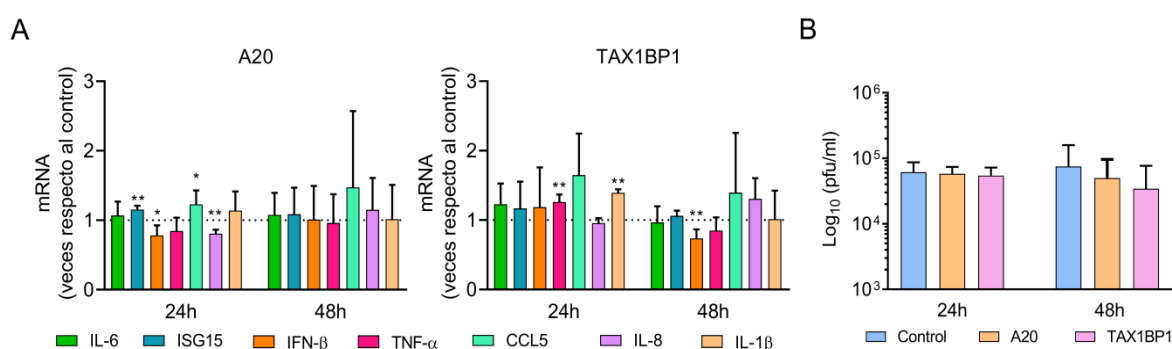


Figura 20: Sobreexpresión de A20 y TAX1BP1. (A) Niveles de expresión de varios genes de respuesta inmune inflamatoria y antiviral en las células transfectadas con los plásmidos de A20 o TAX1BP1. Los niveles del mRNA de estos genes se cuantificaron mediante qPCR. Los resultados que se muestran son los valores obtenidos con respecto a las células transfectadas con un plásmido control. (B) Título viral de los sobrenadantes recogidos a 24 y 48 hpi de las células transfectadas con cada plásmido (control, A20 o TAX1BP1) e infectadas con el VRSH. Los datos representan la media y desviación estándar de al menos tres ensayos independientes. Las comparaciones entre los grupos fueron realizadas por medio de un *t*-test. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

También se analizó la replicación del virus mediante la titulación de los sobrenadantes de cultivo recogidos a 24 y 48 hpi. Se observó un ligero descenso en los títulos del virus en las células transfectadas con plásmidos específicos de A20 y TAX1BP1 a 48 hpi, que no fueron significativos si se comparan con los niveles de replicación viral en las células transfectadas con un plásmido control (Figura 20B).

2.5.2. La expresión conjunta de A20, TAX1BP1 y ABIN1 tampoco modifica la respuesta inmune innata ni la replicación del VRSH

Para poder llevar a cabo su función, A20 frecuentemente tiene que interaccionar con otras proteínas que modulan su actividad y/o especificidad de sustrato (Arguello et al., 2014, Shembade et al., 2008, Shembade et al., 2009). Por ello, se decidió sobreexpresar simultáneamente A20, TAX1BP1 y ABIN1. Para ello se transfectaron las células A549 con una mezcla de los plásmidos que expresan las proteínas que forman el complejo (A20, TAX1BP1 y ABIN1). Veinticuatro horas después de la transfección, se infectaron las células con el VRSH a una MOI de 3, y se recogieron los sobrenadantes a 24 y 48 hpi. Los niveles de expresión de cada uno de los genes fueron cuantificados con respecto a las células control (Anexo I, Figura 3).

Se analizó la expresión génica mediante qPCR para cuantificar el mRNA de los genes seleccionados. En general, no se observaron diferencias en los niveles de expresión de los genes analizados, ni a 24 ni a 48 hpi (Figura 21A) con respecto a las células transfectadas con un plásmido control. Solo *TNF- α* disminuyó de forma muy ligera, aunque estadísticamente significativa, a 24 hpi (Figura 21A).

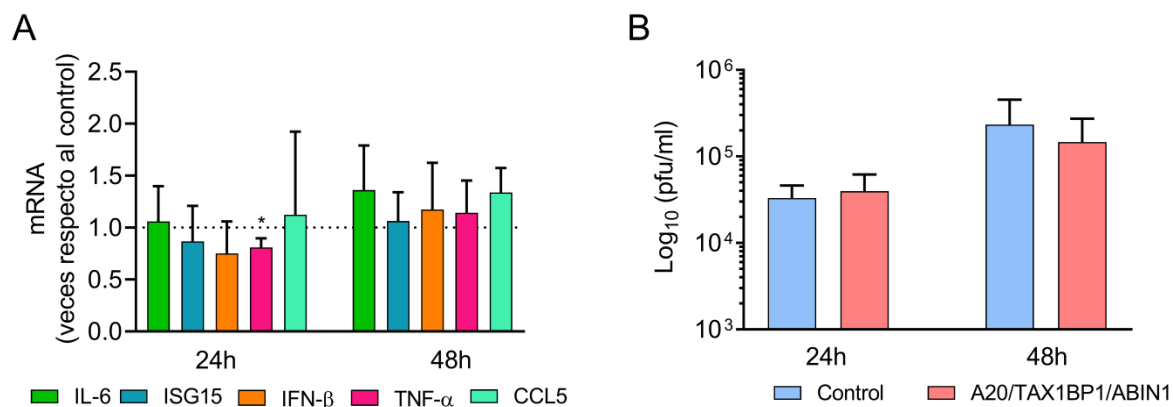


Figura 21: Sobre-expresión simultánea de A20 y las proteínas que interaccionan con ella (TAX1BP1 y ABIN1). (A) Niveles de expresión de varios genes de respuesta inmune innata y antiviral en las células transfectadas con la mezcla de plásmidos (A20, TAX1BP1 y ABIN1). Se cuantificaron los niveles del mRNA de estos genes mediante qPCR. Los resultados que se muestran son los valores obtenidos con respecto a las células transfectadas con un plásmido control. (B) Análisis de la replicación viral mediante la titulación de los sobrenadantes de cultivo recogidos a 24 y 48 hpi de las células transfectadas con las mezclas de plásmidos e infectadas con el VRSH. Los datos representan la media y desviación estándar de al menos tres ensayos independientes. Las comparaciones entre los grupos fueron realizadas por medio de un *t*-test. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

También se analizó la replicación viral mediante la titulación de los sobrenadantes recogidos a 24 y 48 hpi (Figura 21B). Tampoco en este caso se observaron diferencias significativas con respecto a la replicación del virus observada en células transfectadas con un plásmido control.

3. Uso de siRNAs como inhibidores de la replicación del VRSH y moduladores de la respuesta inmune innata

En los últimos años, el empleo de siRNAs como herramienta para tratar diversas patologías, tales como cáncer, desórdenes metabólicos y enfermedades inflamatorias e infecciosas ha crecido de forma importante (Potaczek et al., 2016, Ballarín-González et al., 2013). En las infecciones virales, algunos siRNAs que han sido capaces de llegar a fase de ensayo clínico han sido: ALN-RSV01 frente al VRSH, NucB1000 frente al virus de la hepatitis B (VHB), SPC3649 frente al virus de la hepatitis C (VHC), pHIV7-shI-TAR-CCL5RZ frente a varios genes del VIH y TKM-Ébola frente al virus del ébola (Bitko and Barik, 2001, Qureshi et al., 2018, DeVincenzo, 2012).

Varios estudios han investigado el efecto de la inhibición de diferentes genes del VRSH (*NS1*, *N*, *P*, *F* y *M2-2*) por medio de siRNAs en la replicación del virus (Zhang et al., 2005, DeVincenzo et al., 2008, Alvarez et al., 2009, DeVincenzo et al., 2010, Zamora et al., 2011, Malekshahi et al., 2016, Gottlieb et al., 2016, Bitko et al., 2005, Vig et al., 2009, Chin et al., 2016). Además de la replicación viral, otro objetivo importante es controlar los niveles de expresión de los genes de respuesta inmune innata para evitar la inmunopatología asociada a las infecciones graves por VRSH (Khaitov et al., 2014).

En nuestro trabajo nos propusimos identificar moléculas que fueran capaces de inhibir la replicación del virus y modular la respuesta inmune innata al mismo tiempo. Para poder realizar los ensayos, se diseñaron siRNAs biespecíficos capaces de inhibir la expresión de genes virales y genes celulares de respuesta inmune simultáneamente. Se diseñaron también los correspondientes siRNAs mono-específicos y se comparó el impacto de ambos tipos de siRNAs en la producción de virus y en la respuesta de la célula a la infección.

3.1. Alineamiento del genoma del VRSH con los genes implicados en la señalización intracelular y selección de los siRNAs biespecíficos

Puesto que tanto la replicación del virus como una la respuesta inflamatoria inadecuada parecen contribuir a la severidad de la patología causada por el VRSH, nos propusimos diseñar siRNAs capaces de regular ambos procesos al mismo tiempo, la expresión de genes virales y la inmunidad innata celular. Para ello se llevaron a cabo alineamientos entre el genoma del VRSH (polaridad positiva) y los mRNAs de diferentes genes involucrados en la regulación de la respuesta inmune intracelular (Figura 5). Como resultado de los alineamientos, se detectaron secuencias cortas de entre 12 – 14 nt con una alta homología (más del 80%) entre el genoma del virus y algunos genes celulares. Estas secuencias podrían actuar como diana para los siRNAs que modulan genes celulares y virales. En base a estas secuencias, se diseñaron varios siRNAs para silenciar la combinación de genes virales (*NS1*, *N*, *F*, *L* y la región “tráiler” del virus) y celulares (*A20*, *TAX1BP1*, *CYLD*, *RIG-I*, *TRAF3* y *TRIM25*). Sin embargo, solamente dos siRNAs de todos los que se diseñaron fueron capaces de silenciar el gen viral y celular al mismo tiempo, uno dirigido frente al mRNA de *TRIM25* y el mRNA de la proteína F del virus (*TRIM25/VRSH-F*) y otro dirigido frente al mRNA de *RIG-I* y el mRNA de la nucleoproteína del virus (*RIG-I/VRSH-N*) (Figura 22 y Tabla 8).

siRNA TRIM25/VRSH-F		siRNA RIG-I/VRSH-N	
CACCAUAGACCUCAAAAACGA	TRIM25 (5'–3')	GAGGAACUGGAGCAAGUUGUU	RIG-I (5'–3')
::::::::::::::::::::::::::		::::: ::::::::::::::::::::	
gtGGUAUCUGGAGUUUUUGCU	siRNA (3'–5')	ctCCUUUACCUCGUUCAACAA	siRNA (3'–5')
::::::::::::::::::::::::::		: :::::::::::::: ::::::::::	
AGUGUUAGACCUCAAAAACUA	VRSH-F (5'–3')	GCAGAAAUGGAACAAGUUGUU	VRSH-N (5'–3')

Figura 22: Secuencia de los siRNAs con doble especificidad. Se muestra el apareamiento de bases entre el siRNA biespecífico y la secuencia homóloga en el gen celular y en el gen viral.

El siRNA TRIM25/VRSH-F, es un siRNA comercial diseñado por Ambion (ID # s15204) para silenciar *TRIM25* y el cual encontramos que también silenciaba la expresión de la proteína F del virus. Este siRNA TRIM25/VRSH-F hibrida completamente con los 21 nucleótidos de la secuencia de *TRIM25*. Con respecto a la secuencia de la proteína F, el siRNA hibrida en más del 70% de los nucleótidos,

especialmente con el nucleótido de la posición 1 y los 7 nucleótidos que conforman la región semilla necesaria para el reconocimiento del mRNA diana (Figura 22 y 23). Por otro lado, el siRNA RIG-I/VRSH-N hibrida casi por completo con la secuencia de RIG-I, salvo por un nucleótido en la posición 15 de la región suplementaria, y con más del 85% de la secuencia de la nucleoproteína del virus, manteniendo la hibridación en la posición 1 y la región semilla (Figura 22 y 23).

Nombre	Secuencia sentido (5' – 3')	Secuencia antisentido (5' – 3')
TRIM25	CAACAAGAAUACACGGAAAtt	UUUCCGUGUAUUCUUGUGta
VRSH-F	GCAAAGUGUUAGACCUCAAtt	UUGAGGUCUAACACUUUGCtg
TRIM25/VRSH-F	CCAUAGACCUCAAAAACGAtt	UCGUUUUUGAGGUCUAUGGtg
RIG-I	CAAGAAGAGUACCACUUAAtt	UUAAGUGGUACUCUUCUUGta
VRSH-N (ALN-RSV01)	GGCUCUAGCAAAGUCAAGtt	CUUGACUUUGCUAAGAGCctt
RIG-I/VRSH-N	GGAAUUGGAGCAAGUUGUUt	AACAACUUGCUCCAUUUCCtc

Tabla 8: Secuencias de los siRNAs empleados en el trabajo.

Como controles se diseñaron y sintetizaron siRNAs monoespecíficos frente a los genes virales F (VRSH-F) y N (VRSH-N), otros dos frente a los genes celulares *TRIM25* y *RIG-I* fueron adquiridos comercialmente (Ambion) (Tabla 1). El siRNA monoespecífico VRSH-N tiene una secuencia idéntica a la descrita previamente como ALN-RSV01 (Alvarez et al., 2009). Todos los siRNAs presentan una longitud de 21 nucleótidos, tienen un dinucleótido de DNA en su extremo 3' (Tabla 8), las secuencias frente a las que van dirigidos están dentro de la región codificante del mRNA, y silencian los genes correspondientes en más de un 60% a las 48 h post-transfección. (Anexo I, Figura 4).

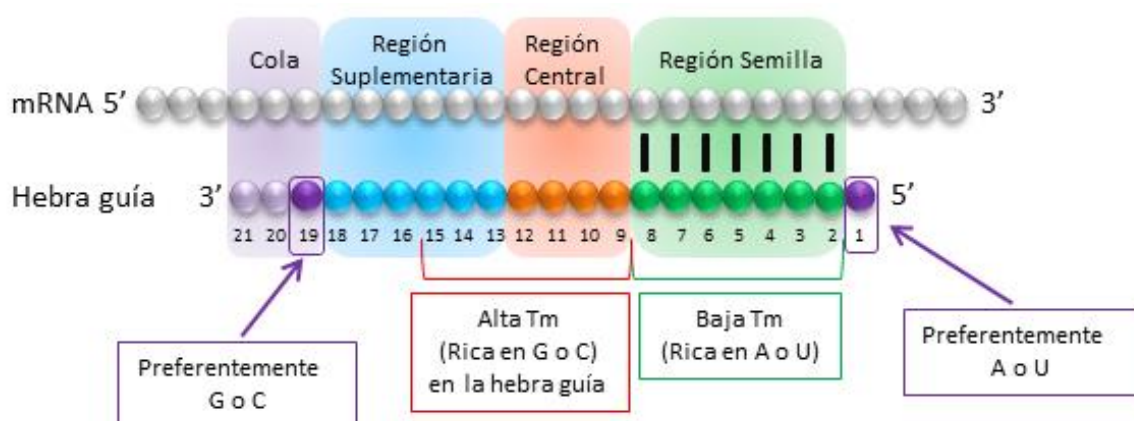


Figura 23. Esquema que muestra las características de las diferentes regiones que determinan la eficacia de un siRNA.

Para asegurarnos de que los siRNAs diseñados no tenían ningún efecto citotóxico, se realizaron ensayos de viabilidad celular. Para ello, se transfectaron las células con los seis siRNAs seleccionados (Tabla 8) y se midió el porcentaje de células viables a 0 y 72 h post-transfección mediante un ensayo con MTT (Figura 24). La tasa de viabilidad celular obtenida a las 0 horas post-transfección (hpt), fue similar a la de las células sin tratar (Figura 24). Sin embargo, a 72 hpt se observó un ligero descenso en la tasa de viabilidad celular en todas las condiciones con respecto a las células sin tratar. Esto puede deberse a la lipofectamina por sí sola, puesto que no se observa un aumento en la citotoxicidad al incluir los diferentes siRNAs en la mezcla de transfección (Figura 24).

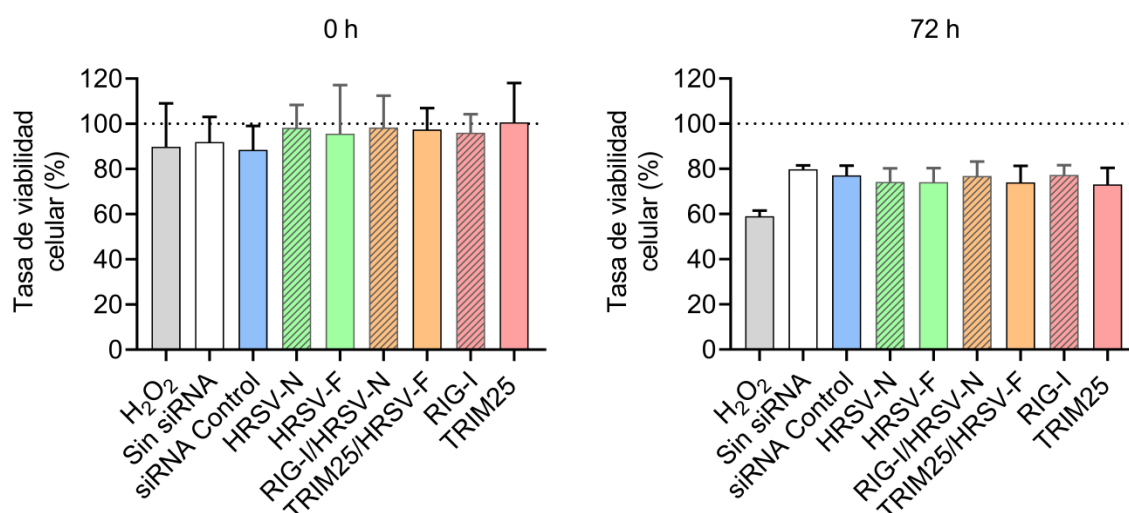


Figura 24: Ensayos de citotoxicidad de los diferentes siRNAs. Para el ensayo se transfectaron las células con los siRNAs seleccionados y se reveló con MTT a 0 y 72 horas post-transfección. Los datos representan la media y desviación standard de cinco ensayos de transfección. Para el control positivo de daño celular, se empleó una dilución 1:2000 de H₂O₂ de un stock al 30%.

3.2. Los siRNAs dirigidos frente a mRNAs del VRSH inhiben la producción de virus

Las células fueron silenciadas con siRNAs mono-específicos, con la mezcla de ellos y con siRNAs bio-específicos, en tres condiciones de infección/transfección diferentes (Figura 25): (i) Transfección de las células con los correspondientes siRNAs e infección 24 horas más tarde a una MOI de 3 (siRNA/VRSH MOI 3); (ii) Infección de las células a una MOI de 3 y transfección 8 horas más tarde con los siRNAs específicos para cada gen (VRSH MOI 3/siRNA); (iii) Infección de las

células a una MOI de 0.1 y transfección 8 horas más tarde con cada uno de los siRNAs específicos para cada gen (VRSH MOI 0.1/siRNA). Las tres condiciones diferentes nos permitieron analizar tres escenarios distintos de tratamiento frente al VRSH: (i) Tratamiento profiláctico frente a la infección; (ii) Tratamiento terapéutico en un escenario en el que aproximadamente el 100% de las células están infectadas; (iii) Como inhibidor de la replicación y diseminación del virus en el caso en el que alrededor del 10% de las células están infectadas.

En las tres condiciones descritas anteriormente se observó un descenso de la replicación viral a 48 hpi en los sobrenadantes de las células transfectadas con los siRNAs biespecíficos (TRIM25/VRSH-F y RIG-I/VRSH-N), los siRNA monoespecíficos frente al mRNA de la proteína F (VRSH-F) y N (VRSH-N) y la mezcla de los siRNAs frente al mRNA de la proteína F y TRIM25 (VRSH-F + TRIM25) y la N y RIG-I (VRSH-N + RIG-I) recogidos a 48 hpi (Figura 25). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los títulos de los sobrenadantes de las células transfectadas solamente con los siRNAs frente a TRIM25 o RIG-I, ni a 24 ni a 48 hpi (Figura 25).

En cuanto a las condiciones empleadas, el descenso en los niveles de replicación del VRSH fue aproximadamente 10 veces mayor cuando la transfección con los siRNAs se realizó antes de la infección con el VRSH (siRNA/VRSH MOI 3, Figura 25). Es decir, la administración de los siRNAs antes de la infección previene su progresión, ya que los títulos virales en estas células no incrementan de 24 a 48 hpi (Figura 25). Sin embargo, cuando se administran los siRNAs tras la infección (VRSH MOI 3/siRNA y VRSH MOI 0.1/siRNA), la replicación del VRSH sí aumenta, aunque menos que en los controles, de 24 a 48 hpi. Este aumento es menor en el caso de los siRNAs frente a los mRNAs de la proteína F e infecciones a una MOI de 0.1 (Figura 25).

Los siRNAs VRSH-F, TRIM25/VRSH-F y la combinación de TRIM25 y VRSH-F (mezcla) tuvieron un efecto similar sobre la producción de virus entre ellos en las diferentes condiciones. Por el contrario, los siRNAs VRSH-N y la combinación de RIG-I con VRSH-N (mezcla), inhiben la replicación del virus de forma similar, pero mayor que el siRNA biespecífico RIG-I/VRSH-N, especialmente cuando son administrados antes de la infección (siRNA/VRSH MOI 3, Figura 25).

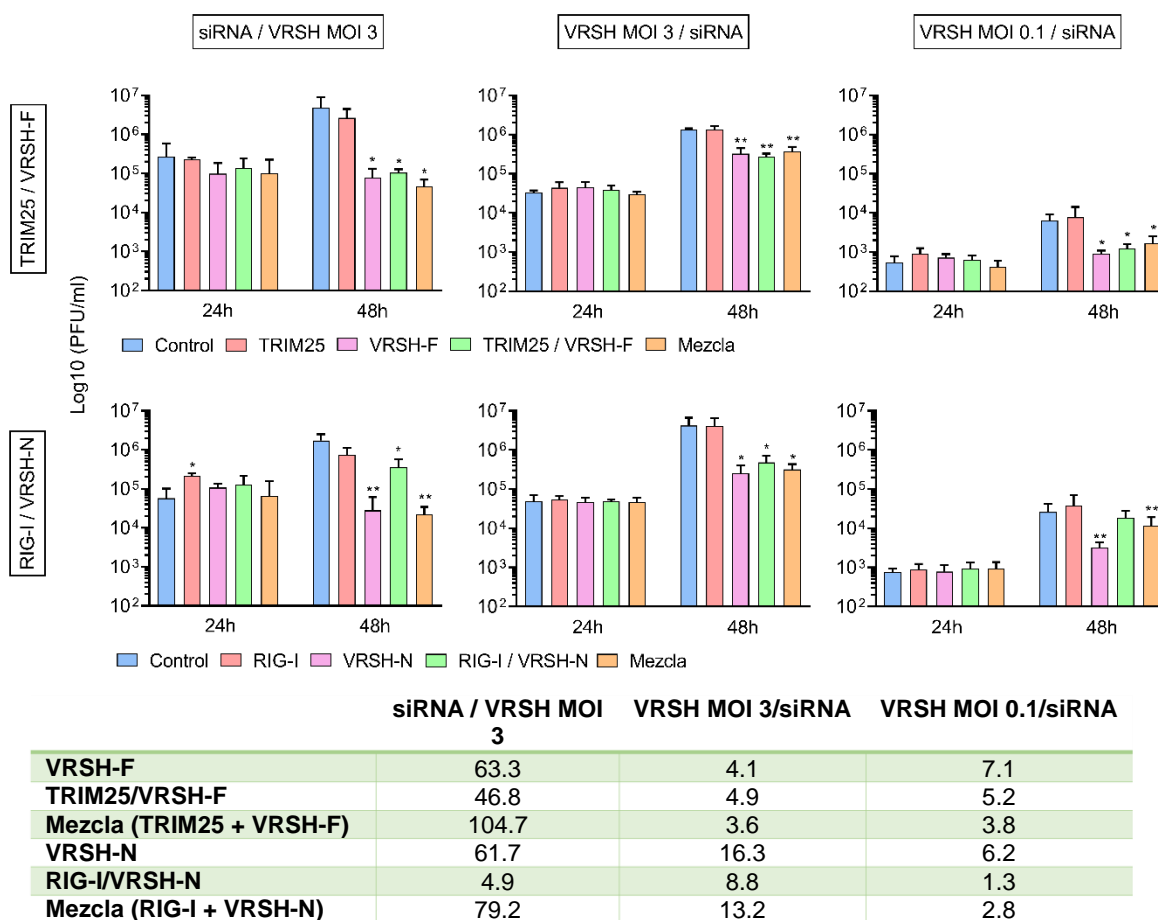


Figura 25: Titulación de los sobrenadantes recogidos a 24 y 48 hpi de las células transfectadas con los diferentes siRNAs e infectadas con el VRSH. En la parte superior se muestran los resultados de las células transfectadas con los siRNAs frente a TRIM25, VRSH-F, TRIM25/VRSH-F y la combinación de TRIM25 y VRSH-F (Mezcla). En la parte inferior, los resultados de las células transfectadas con los siRNAs frente a RIG-I, VRSH-N, RIG-I/VRSH-N y la mezcla de RIG-I y VRSH-N (Mezcla). Las células fueron transfectadas antes o después de la infección con el VRSH. siRNA/VRSH MOI 3: Células transfectadas e infectadas 24 horas más tarde con el VRSH a una MOI de 3. VRSH MOI 3/siRNA: Células infectadas con el VRSH a una MOI de 3 y transfectadas 8 horas más tarde. VRSH MOI 0.1/siRNA: Células infectadas con el VRSH a una MOI de 0.1 y transfectadas 8 horas más tarde. En la tabla se muestra la media del número de veces que baja la replicación viral en las células transfectadas con los siRNAs correspondientes a 48 hpi para cada condición. Los datos representan la media y desviación estándar de al menos tres ensayos independientes. Las comparaciones entre los grupos fueron realizadas por medio de un *t*-test. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

3.3. El silenciamiento de la N, pero no el de la F, produce una inhibición generalizada de la expresión del RNA y proteínas virales

Puesto que las mayores diferencias en los niveles de replicación del virus se encuentran cuando las células son transfectadas con los diferentes siRNAs, y posteriormente son infectadas (siRNA/VRSH MOI 3), analizamos los niveles de

expresión de algunas proteínas virales para esta condición, cuantificando su mRNA por qPCR y analizando la acumulación de proteína por western blot (Figura 26 y 27).

En el análisis de los títulos virales, apenas se observaron diferencias entre las células transfectadas con los siRNAs frente al mRNA de la proteína F y los siRNAs frente al mRNA de la N (Figura 25). Sin embargo, al analizar los niveles de expresión de las proteínas del virus, sí se observan diferencias entre las células transfectadas con unos siRNAs y otros. Los siRNAs dirigidos frente al mRNA de la F (VRSH-F, TRIM25/VRSH-F y la combinación de TRIM25 y VRSH-F (mezcla)) disminuyeron sólo los niveles de expresión de la proteína F tanto a nivel del mRNA (Figura 26A) como de la proteína (Figura 27A) a 24 y 48 hpi, pero no los de otras proteínas virales. Por el contrario, los siRNAs dirigidos frente al mRNA de la N (VRSH-N, RIG-I/VRSH-N y la combinación de RIG-I y VRSH-N (mezcla)) no solamente inhiben la expresión de la nucleoproteína del virus, sino que además inhiben fuertemente la expresión del resto de las proteínas virales analizadas (N, F, NS1, L, G, M y P), tanto a nivel de mRNA como de proteína a 24 y 48 hpi (Figura 26B y 27B). Al igual que se observó en los niveles de replicación viral, el siRNA biespecífico RIG-I/VRSH-N fue menos efectivo que los siRNAs VRSH-N o la combinación de RIG-I y VRSH-N (Figura 26B). Como era de esperar, los siRNAs frente a TRIM25 y RIG-I no afectaron a los niveles de expresión de las proteínas virales analizadas en ningún caso (Figura 26 y 27).

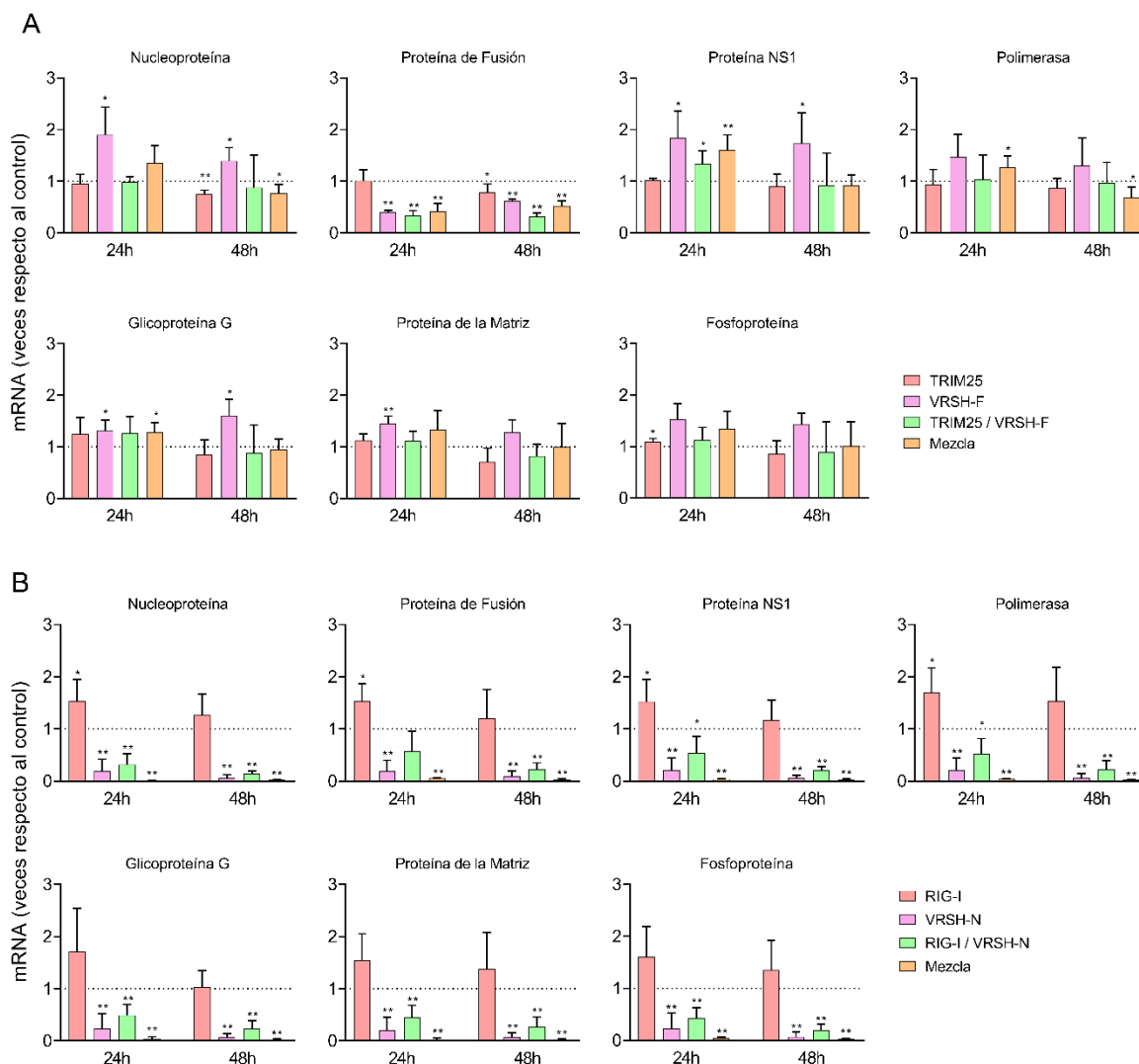
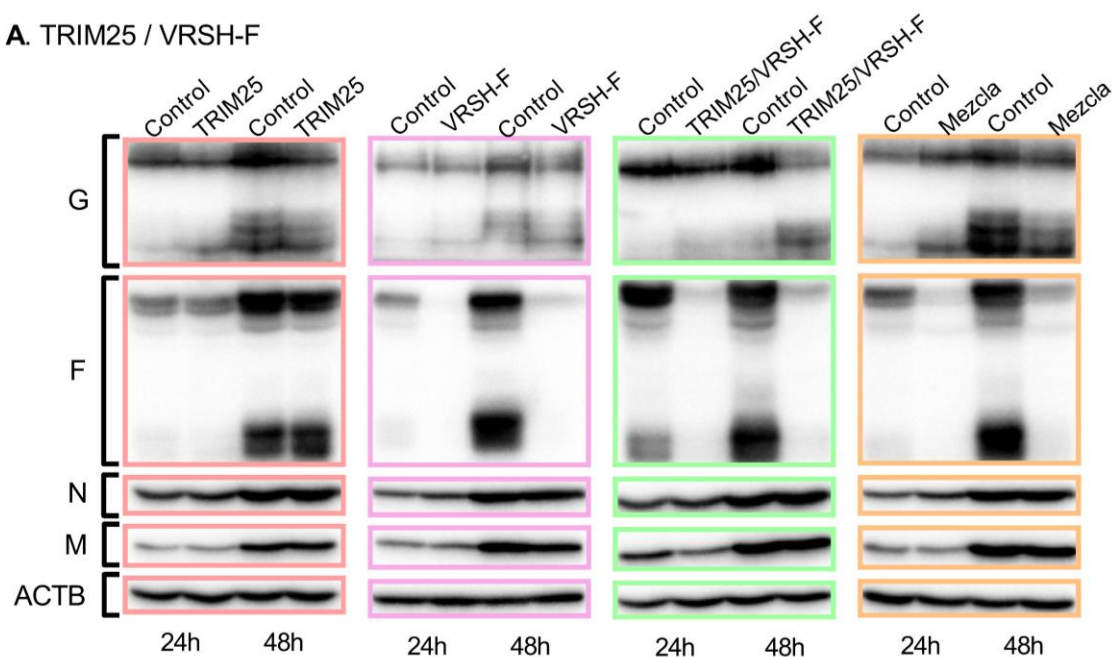


Figura 26: Niveles de expresión de los mRNAs de las proteínas del virus a 24 y 48 hpi cuantificados por qPCR. (A) Resultados de las células transfectadas con los siRNAs frente a TRIM25, VRSH-F, TRIM25/VRSH-F y la combinación de TRIM25 y VRSH-F (Mezcla). (B) Resultados de las células transfectadas con los siRNAs frente a RIG-I, VRSH-N, RIG-I/VRSH-N y la mezcla de RIG-I y VRSH-N (Mezcla). En ambos casos se muestran los resultados con respecto a las células transfectadas con un siRNA control. Los datos representan la media y desviación estándar de al menos tres ensayos independientes. Las comparaciones entre los grupos fueron realizadas por medio de un *t*-test. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

A. TRIM25 / VRSH-F



B. RIG-I / VRSH-N

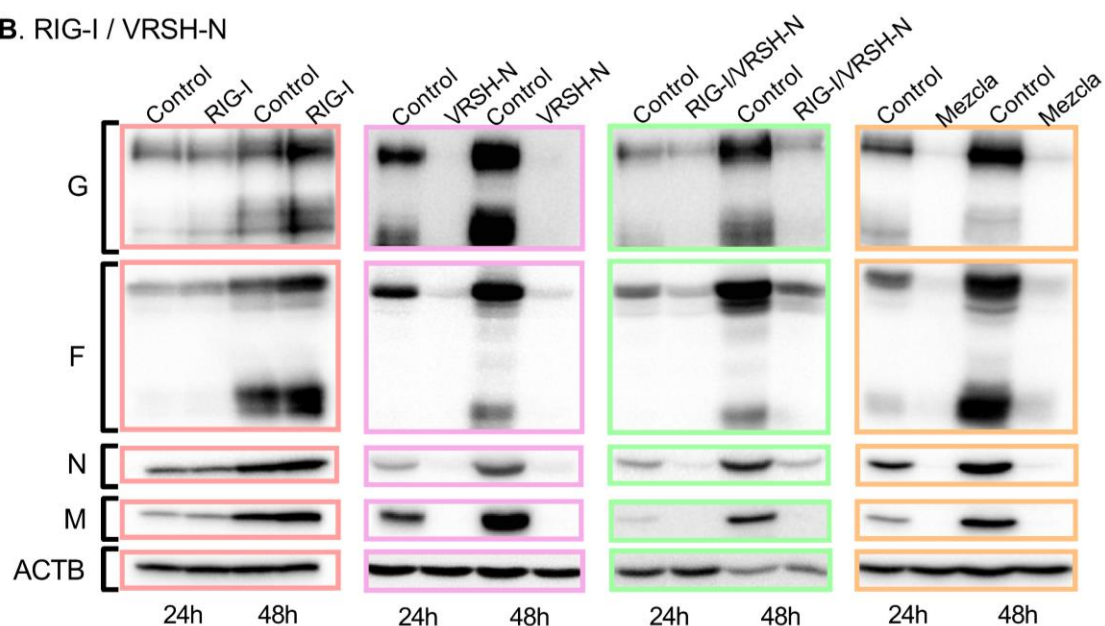


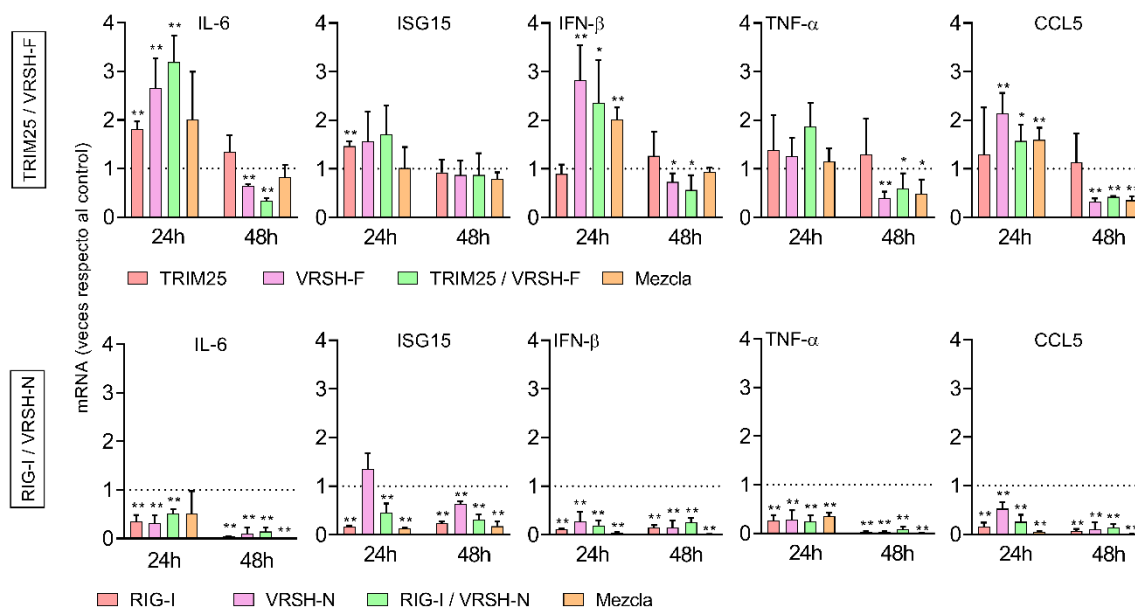
Figura 27: Niveles de las proteínas del virus (G, F, N y M) en las células transfectadas con los diferentes siRNAs e infectadas 24 horas más tarde a una MOI de 3. Las proteínas se extrajeron a 24 y 48 hpi y se analizaron por medio de western blot con anticuerpos específicos. (A) Células transfectadas con los siRNAs TRIM25, VRSH-F, TRIM25/VRSH-F y la combinación de TRIM25 y VRSH-F (Mezcla). (B) Células transfectadas con los siRNAs RIG-I, VRSH-N, RIG-I/VRSH-N y la combinación de RIG-I con VRSH-N (Mezcla). Como control interno, se muestran los niveles de actina- β (ACTB). Los resultados se comparan con los niveles de expresión de las mismas proteínas virales en células transfectadas con un siRNA control.

3.4. Los siRNAs frente a la N reducen drásticamente la respuesta inmune innata celular mientras que los siRNAs frente a la F tienen un efecto moderado

La respuesta inmune innata inducida por el VRSH fue analizada en las tres condiciones de infección/transfección midiendo los niveles del mRNA de *IL-6*, *ISG15*, *IFN- β* , *TNF- α* y *CCL5*. En general los siRNAs dirigidos frente al mRNA de la proteína F (VRSH-F, TRIM25/VRSH-F y la combinación de TRIM25 y VRSH-F) redujeron ligeramente los niveles de expresión de todos los genes analizados a 48 hpi pero no a 24 hpi, en cualquiera de las 3 condiciones (Figura 28). Sin embargo, el descenso de los niveles de expresión de *ISG15* no fue significativo al administrar el siRNA antes de infectar las células (siRNA/VRSH MOI 3, Figura 28A), o cuando la infección se realizó a una MOI de 0.1 antes de la transfección (VRSH 0.1/siRNA, Figura 28C). Cuando los siRNAs frente al mRNA de la proteína F son administrados antes de la infección (siRNA/VRSH MOI 3), los niveles de expresión de *IL-6*, *IFN- β* y *CCL5* incrementaron significativamente a 24 hpi (Figura 28A). En el caso de las transfecciones con el siRNA frente al mRNA de TRIM25 no se observaron grandes cambios en los niveles de expresión ni a 24 ni a 48 hpi en ninguna de las tres condiciones analizadas (Figura 28).

Por el contrario, cuando las células se transfectan con los siRNAs frente al mRNA de la nucleoproteína del virus (VRSH-N, RIG-I/VRSH-N y la mezcla de RIG-I y VRSH-N), se observa un fuerte descenso de la respuesta inmune innata a 48 hpi en las tres condiciones analizadas (Figura 28). Cuando los siRNAs son añadidos antes de la infección con el VRSH, este descenso en los niveles de la respuesta inmune innata también sucede a 24 hpi (Figura 28), aunque cuando los siRNAs son añadidos después de la infección, este descenso a 24 hpi solamente sucede para algunas citoquinas (Figura 28B y C). Al contrario de lo que ocurre en las células transfectadas con el siRNA monoespecífico de TRIM25, en las células silenciadas con el siRNA RIG-I, también se observa un descenso significativo en la respuesta inmune innata (Figura 28).

A. siRNA / VRSH MOI 3



B. VRSH MOI 3 / siRNA

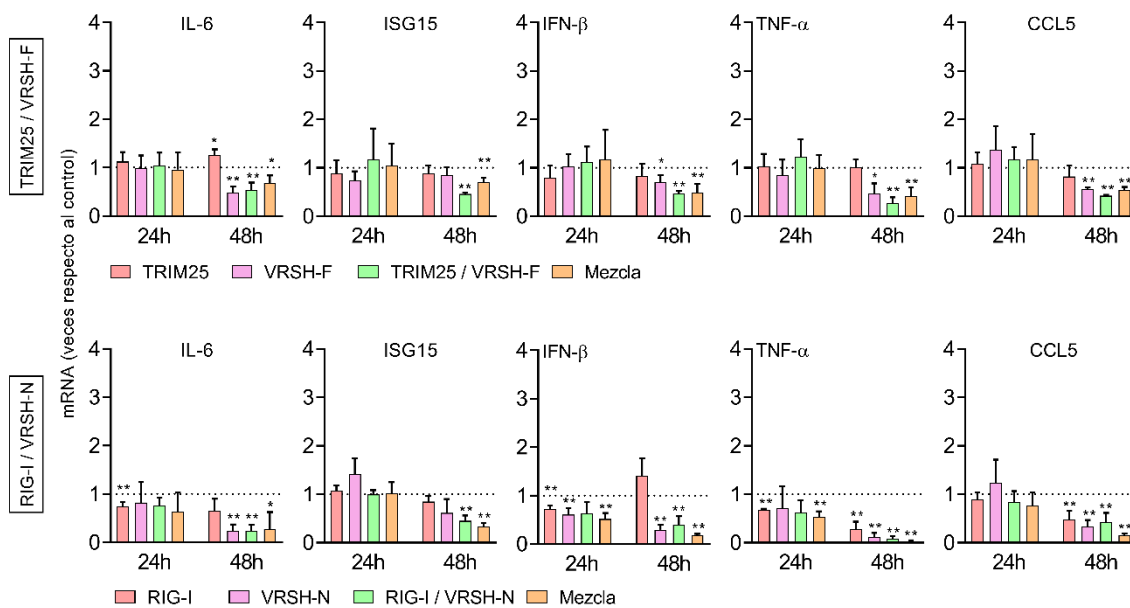


Figura 28: Cont

C. VRSH MOI 0.1 / siRNA

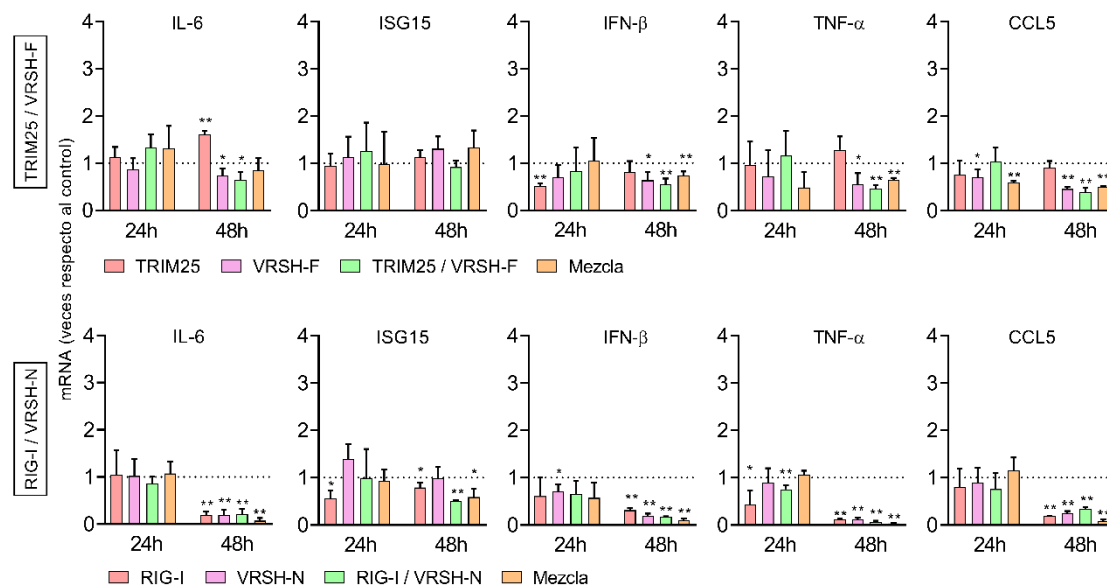


Figura 28: Niveles de expresión de los genes de respuesta inmune innata en las células transfectadas con los diferentes siRNAs. Se realizó la cuantificación del mRNA a 24 y 48 hpi, por medio de qPCR, de los genes seleccionados. (A) Células transfectadas con cada siRNA e infectadas 24 horas más tarde a una MOI de 3. (B) Células infectadas a una MOI de 3 y transfectadas con los correspondientes siRNAs 8 horas más tarde. (C) Células infectadas a una MOI de 0.1 y transfectadas 8 horas más tarde con los siRNAs correspondientes. Los resultados que se muestran son los valores obtenidos en las células transfectadas con los diferentes siRNAs, con respecto a las células transfectadas con un siRNA control. Los datos representan la media y desviación estándar de al menos tres ensayos independientes. Las comparaciones entre los grupos fueron realizadas por medio de un *t*-test. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

En la infección por el VRSH, se ha visto que tanto la replicación del virus como una respuesta inflamatoria exacerbada, parecen ser los responsables de la severidad de la patología (Graham et al., 2000, Openshaw and Tregoning, 2005, Tripp, 2004, Collins and Graham, 2008). Las células epiteliales respiratorias constituyen el blanco principal del VRSH y es en ellas donde se inicia la respuesta inmune/inflamatoria del huésped. Esta respuesta está regulada principalmente por modificaciones post-traduccionales de muchas de las proteínas que intervienen en las rutas de señalización inmune intracelular. Entre estas modificaciones, los procesos de ubiquitinación/deubiquitinación parecen jugar un papel fundamental (Hu and Sun, 2016). Entender cómo se regula este proceso inflamatorio ayudaría a evitar sus efectos patológicos y podría aportar información relevante para el desarrollo de potenciales dianas terapéuticas con el objetivo de controlar tanto la replicación del virus como la inmunopatología asociada a la infección.

En este trabajo, nos hemos centrado en investigar el papel de diferentes ubiquitinasa/deubiquitinasa celulares en la replicación del VRSH y la respuesta inmune a la infección. Especialmente, se ha analizado la función de la deubiquitinasa TNFAIP3/A20, un regulador negativo de los factores de transcripción NF- κ B e IRF3/7. El principal hallazgo del estudio es que la inhibición de la expresión de A20 mediante siRNAs específicos, o la ausencia de expresión en células KO, da lugar a un aumento en la respuesta antiviral/inflamatoria, subida de los niveles de apoptosis y un descenso en la producción de virus. En estos procesos parece que A20 necesita la cooperación de otras proteínas, como TAX1BP1 y ABIN1, puesto que se observaron resultados similares en células con reducida expresión de esas proteínas debido al tratamiento con siRNAs específicos.

En este estudio, también se diseñaron nuevos siRNAs que silenciaban la expresión de genes celulares involucrados en la respuesta inmune, genes virales o ambos a la vez (siRNAs biespecíficos). Los siRNAs monoespecíficos y también los biespecíficos dirigidos contra genes virales redujeron la producción de citoquinas proinflamatorias y de virus. Una observación interesante fue que, mientras los siRNAs dirigidos contra los genes N y F del VRSH redujeron el título viral en la

misma medida, difirieron de forma acusada en su capacidad de inhibir la acumulación de RNA y proteínas virales, así como en la atenuación de la respuesta antiviral/inflamatoria.

1. Papel de RIG-I en la respuesta inmune celular a la infección por el VRSH

RIG-I es uno de los principales receptores celulares, que se activan tras la infección de virus de RNA, mediante el reconocimiento del RNA viral con extremos 5'-trifosfato (Sun and Lopez, 2017, Liu et al., 2007). Su actividad está principalmente modulada por procesos de ubiquitinación/deubiquitinación en los que participan diferentes proteínas con actividad E3 ubiquitin ligasa y deubiquitinasa, tales como TRIM25, RNF135 (RIPLET), CYLD, RNF125, etc. (Gack et al., 2007, Hu and Sun, 2016). Una vez que se activa RIG-I, interacciona con el adaptador mitocondrial MAVS (Sun and Lopez, 2017, Schmidt and Varga, 2017) para llevar a cabo la transducción de la señal (Kumar et al., 2011). El resultado de esta interacción es la activación de dos intermediarios de la ruta, TRAF3 y TRAF6 (Sun and Ley, 2008, Gack et al., 2007), que finalmente activan dos factores de transcripción NF- κ B e IRF3, para inducir la producción de citoquinas proinflamatorias e IFN tipo I (Hu and Sun, 2016).

En trabajos previos, se ha descrito que, en las células epiteliales respiratorias, RIG-I es uno de los principales receptores celulares que desencadena la respuesta inmune innata frente al VRSH (Sun and Lopez, 2017, Liu et al., 2007). Nuestros resultados concuerdan con estos datos, puesto que hemos observado un descenso drástico y generalizado de la respuesta inflamatoria/antiviral al silenciar la expresión de RIG-I en infecciones por el VRSH (Liu et al., 2007). Además, se observó un ligero incremento, aunque estadísticamente significativo, en la producción de virus a 24 hpi, el cual podría deberse a los bajos niveles de expresión de genes de respuesta inmune antiviral observados tras la inhibición de la expresión de RIG-I, puesto que una baja respuesta inmune podría favorecer la replicación del virus (Openshaw et al., 2017). Sin embargo, a las 48 hpi, no se observan diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento del virus en las células silenciadas para RIG-I con respecto a las células control, a pesar del descenso en la respuesta inmune. Esta discrepancia observada entre las 24 y 48 hpi podría deberse a que a

24 hpi el crecimiento del VRSH en las células A549 todavía está en fase exponencial, mientras que a 48 hpi se habría alcanzado la fase de meseta (“plateau”). En la fase exponencial se pueden detectar diferencias entre distintas condiciones de infección, mientras que eso, normalmente no es posible en la fase de “plateau”.

La señalización desencadenada por RIG-I se divide en dos principales rutas, representadas por las dos proteínas adaptadoras, TRAF3 y TRAF6 (Hacker et al., 2006, Oganessian et al., 2006) (Figura 5). En los silenciamientos de la expresión de estos adaptadores también se observa un ligero descenso en los niveles de expresión de genes de respuesta inmune inflamatoria/antiviral, aunque su efecto no es tan drástico como en el caso de RIG-I. Este hecho estaría en consonancia con que la señal de RIG-I se divide en dos o más rutas a medida que se avanza en la cascada de señalización (Figura 5). Además, la falta de TRAF3 o TRAF6 puede estar compensada, en cierta medida, por otros miembros de la familia TRAF (Zeng et al., 2009, Liu et al., 2013, Hu and Sun, 2016).

1.1. Regulación de RIG-I por ubiquitininasas y deubiquitininasas

El receptor RIG-I está principalmente regulado por procesos de ubiquitinación/deubiquitinación, por lo que se analizó el impacto de cuatro moduladores del receptor con actividad E3 ubiquitin ligasa (TRIM25, RNF135 (RIplet) y RNF125) o deubiquitinasa (CYLD) (Xu et al., 2018).

De acuerdo con su papel como activador de RIG-I, el silenciamiento de RNF135 (RIplet) dio lugar a un descenso en los niveles de respuesta inflamatoria/antiviral, sobre todo a 48 hpi. Sin embargo, en el caso del silenciamiento de la expresión de TRIM25, también un activador de RIG-I, no se observaron diferencias en la respuesta inmune. Recientemente, se ha descrito que la actividad de TRIM25 parece jugar un doble papel en la activación de RIG-I, actuando como regulador positivo y negativo. En su papel como proteína activadora, TRIM25 ubiquitina vía K63 la lisina de la posición 172 (K172) del segundo dominio CARD de RIG-I, favoreciendo su actividad e interacción con MAVS (Gack et al., 2007, Martín-Vicente et al., 2017). Por el contrario, en su calidad de proteína inhibidora, TRIM25 puede actuar (i) ubiquitinando vía K48 el adaptador mitocondrial MAVS, para ser degradado vía proteasoma e inhibir la señalización y activación de IRF3 e IFN-I

(Castanier et al., 2012, Karbowski and Youle, 2011), o (ii) puede unirse a la proteína FAT10, para estabilizarla y favorecer la acumulación en el citoplasma del complejo formado por RIG-I y FAT-10, impidiendo la interacción de RIG-I con MAVS (Nguyen et al., 2016). Por tanto, al silenciar la expresión de TRIM25, la activación de RIG-I estaría disminuida, pero se evitaría la degradación de MAVS y la acumulación del complejo FAT-10/RIG-I en el citoplasma. En definitiva, el efecto del papel de TRIM25 como modulador positivo estaría compensado por el efecto de su papel como modulador negativo, haciendo que no se aprecien diferencias en la respuesta inmune inflamatoria/antiviral de las células silenciadas para TRIM25 en comparación con las células silenciadas con un siRNA control. Además, también se ha descrito recientemente que TRIM25 y RNF135 (RIPLET) no tienen el mismo efecto activador sobre RIG-I en infecciones por el virus de la influenza, siendo RNF135 (RIPLET), pero no TRIM25, necesario para la activación de IRF3 y la inducción de IFN tipo I (Hayman et al., 2019). Por tanto, un mecanismo similar podría estar operando en las infecciones por el VRSH.

En cuanto a las proteínas que inhiben la actividad de RIG-I (RNF125 y CYLD), en las células silenciadas para RNF125 no se observan grandes diferencias con respecto a las células silenciadas con un siRNA control. Es posible que la ausencia de RNF125 esté compensada por otras proteínas con actividad E3 ligasa, como puede ser el caso de RNF122 (Wang et al., 2016). Al silenciar la expresión de CYLD, se esperaría un incremento en los niveles de respuesta inflamatoria/antiviral, lo que solo sucede a 24 hpi para *IFN- β* y *TNF- α* , este último sin llegar a ser significativo. Sin embargo, se observa un descenso en la replicación del virus, aunque solo es significativo a 48 hpi. Ambos resultados no coinciden con el papel esperado de CYLD en la regulación de RIG-I. Varios estudios han mostrado la implicación de CYLD en la proliferación celular y la formación de microtúbulos (Stegmeier et al., 2007, Liu et al., 2012, Gao et al., 2008). Por tanto, el silenciamiento de CYLD podría estar reduciendo la división de las células infectadas y, como consecuencia, la producción del virus. Además, los microtúbulos y filamentos de actina del citoesqueleto son esenciales para el ensamblaje y maduración del VRSH (Zhang et al., 2002). Esto explicaría el descenso en el título viral, el cual, a su vez, provocaría un descenso en la respuesta inmune (Martín-Vicente et al., 2019).

2. Modulación de la respuesta inmune y la replicación del VRSH por A20

El papel de A20 como regulador negativo en la señalización desencadenada por RIG-I, así como en procesos de apoptosis, inflamación o enfermedades autoinmunes, ha sido ampliamente descrito (Shao et al., 2013, Shi and Kehrl, 2010, Lin et al., 2006, Saitoh et al., 2005). Puesto que, en la infección por el VRSH, la activación de la respuesta inflamatoria/antiviral en las células epiteliales infectadas depende en gran medida de la activación del receptor RIG-I, con la subsecuente activación de los factores de transcripción NF- κ B e IRF3/7 (Liu et al., 2007, Shao et al., 2013, Shi and Kehrl, 2010, Lin et al., 2006, Saitoh et al., 2005), nos propusimos investigar si A20 regulaba de alguna forma la respuesta celular durante la infección por el VRSH. Nuestros resultados demuestran que, efectivamente, A20 está involucrada en la regulación de la respuesta inmune celular, la apoptosis y la replicación del virus en células epiteliales infectadas por el VRSH. Así, observamos un incremento en los niveles de expresión de varios genes de respuesta inmune innata a 24 hpi en las células silenciadas con un siRNA frente a A20. También se observó un incremento en los niveles de apoptosis y un descenso en el crecimiento del virus en estas mismas células a 48 hpi. Resultados similares se obtuvieron en células tratadas con un siRNA frente a TAX1BP1 o ABIN1, indicando que estas proteínas estarían cooperando con A20 en estos procesos, tal y como se ha descrito en otros escenarios (Catrysse et al., 2014, Shembade and Harhaj, 2012, Harhaj and Dixit, 2011). Sin embargo, los silenciamientos de ITCH y RNF11 mostraron resultados distintos. En las células silenciadas para RNF11, no se observaron diferencias en cuanto a los niveles de respuesta inmune, apoptosis o replicación del virus, con respecto a las células silenciadas con un siRNA control. Estos resultados indican que RNF11 no interacciona con A20 para llevar a cabo la regulación de las rutas de señalización inducidas en las células infectadas por el VRSH, a pesar de que sí parece formar un complejo junto a A20, TAX1BP1 e ITCH para inhibir la activación de NF- κ B inducida por lipopolisacáridos y TNF- α (Shembade et al., 2009, Shembade et al., 2008). En el caso del silenciamiento de *ITCH*, los resultados son más difíciles de interpretar, ya que el impacto sobre la respuesta inflamatoria/antiviral en la infección por VRSH fue menor que en el caso de las células silenciadas para A20, TAX1BP1 o ABIN1. Sin embargo, la reducción en la

replicación del VRSH o el efecto sobre los niveles de apoptosis fueron similares a los observados al silenciar A20, TAX1BP1 o ABIN1. En línea con estos datos, se ha descrito que TAX1BP1 interacciona junto a ITCH para ubiquitinar MAVS vía K48 y promover su degradación por el proteasoma, lo que reduce la apoptosis celular inducida por el virus de la estomatitis vesicular o el virus Sendai (Choi et al., 2017). En la infección por el VRSH podría estar ocurriendo algo similar, lo que explicaría el aumento en los niveles de apoptosis detectados en las células silenciadas para ITCH. A su vez, el aumento de apoptosis podría explicar, al menos en parte, el descenso de la replicación del VRSH observada en nuestro estudio.

Para confirmar el papel de A20 en la señalización desencadenada por el VRSH, se llevaron a cabo ensayos similares en líneas celulares KO para A20. En general, los resultados obtenidos confirmaron los resultados de los silenciamientos. Así, se observó un incremento en los niveles de expresión de los genes de respuesta inmune inflamatoria y antiviral, un incremento en los niveles de apoptosis y un descenso en la replicación del virus en estas células deficientes en A20. Sin embargo, las dos líneas celulares KO difieren significativamente entre ellas en la respuesta inmune innata tras la infección con el VRSH, así como con las células parentales silenciadas para A20. Estas diferencias podrían deberse a que las líneas celulares KO tienen un origen clonal y podrían haber sufrido cambios epigenéticos durante su expansión tendentes a compensar, al menos en parte, la ausencia de A20. Además, hay que tener en cuenta que las líneas celulares establecidas como A549 no son poblaciones celulares completamente homogéneas, por lo que en el proceso de clonación se podrían haber seleccionado células con fenotipos, o incluso genotipos, ligeramente diferentes.

La inhibición de la expresión de A20, TAX1BP1 o ABIN1 aumenta la respuesta inflamatoria/antiviral frente a la infección por el VRSH a 24 hpi, pero no a 48 hpi. Existen al menos dos posibles explicaciones para este resultado: (i) Aunque A20 regula de forma negativa la ruta canónica de NF- κ B, se ha descrito que ésta proteína también activa la ruta no canónica mediante un mecanismo no catalítico (Yamaguchi et al., 2013). La ruta no canónica se activa en células infectadas por el VRSH (Choudhary et al., 2005), y nosotros también hemos visto que varios genes involucrados en esta ruta, incluidos *NFKB2*, *RELB* y *NIK*, se sobreexpresan a tiempos tardíos post-infección (Martínez et al., 2007). Es posible que a 48 hpi la

activación de la ruta canónica en las células silenciadas se vea compensada por la inhibición de la ruta no canónica. Sin embargo, no se ha demostrado si la activación de la ruta no canónica por A20 requiere de la cooperación de TAX1BP1 y ABIN1. Para añadir complejidad al tema, además de las rutas canónica y no canónica, existe una ruta que conecta ambas y que opera en las células infectadas por el VRSH después de RIG-I, dando lugar a la activación del complejo NIK-IKK α y la liberación de RelA (Liu et al., 2008). (ii) La inhibición de la expresión de A20, TAX1BP1 y ABIN1 disminuye los niveles de la replicación del virus a tiempos tardíos post-infección, y esto podría haber contribuido a reducir la respuesta inmune intracelular a este tiempo. Se ha visto que la inhibición de la replicación del VRSH disminuye la respuesta inflamatoria/antiviral en células infectadas (Martín-Vicente et al., 2019), como se discutirá más adelante.

Para confirmar los resultados obtenidos en las líneas celulares KO y en los ensayos de silenciamiento con siRNAs, se llevaron a cabo ensayos de sobreexpresión en células infectadas con el VRSH. Aunque se transfectaron las células con los plásmidos que expresan A20 o TAX1BP1 por separado o de forma conjunta, no observamos diferencias en los niveles de expresión de genes de respuesta inmune, ni en los niveles de replicación viral con respecto a las células transfectadas con un plásmido control e infectadas con el VRSH. Los resultados de sobreexpresión son más complejos de llevar a cabo que los ensayos de silenciamiento mediante siRNAs, especialmente cuando varios genes tienen que expresarse en una única célula para reconstruir la funcionalidad de un complejo proteico. Además, puesto que A20 puede interaccionar con distintas proteínas para llevar a cabo diferentes funciones (Shembade et al., 2007, Shembade et al., 2008, Shembade et al., 2009, Wagner et al., 2008), otras proteínas todavía no identificadas, además de A20, TAX1BP1 o ABIN1, podrían formar parte del complejo necesario para la regulación intracelular de la respuesta inmune innata frente al VRSH.

En el trabajo se muestra cómo la expresión de A20 se induce a tiempos tardíos post-infección en las células infectadas por el VRSH. Esto concuerda con la idea de que uno de los principales papeles de A20 es contribuir a la terminación de la respuesta inmune para evitar así el daño tisular que podría causar dicha respuesta. Sin embargo, el aumento en la expresión de A20 a tiempos tardíos

también podría ser beneficioso para el virus. Así, una observación interesante de nuestro estudio es que la producción de virus se redujo a 48 hpi en las células tratadas con siRNAs frente a A20, TAX1BP1 y ABIN1, así como en las células KO para A20. Esto puede ser debido al aumento de la respuesta antiviral observado en esas células. En línea con esto, ha sido descrito que A20 promueve la replicación del virus Influenza al suprimir la respuesta antiviral de las células infectadas (Feng et al., 2017). De forma similar, también se ha demostrado que A20 promueve la replicación de CMV y VHC (Lee et al., 2019, Song et al., 2016, Gu et al., 2014). Además, el incremento en la apoptosis observado tanto en las células silenciadas, como en las líneas celulares KO, también podría haber contribuido a reducir la producción de virus. La apoptosis es un mecanismo de muerte celular programada que restringe el crecimiento microbiano (Lamkanfi and Dixit, 2010). De acuerdo con esto, se ha descrito que la inhibición de la apoptosis promueve la replicación del VRSH (Bitko et al., 2007, Li et al., 2018). Por lo tanto, la expresión de A20 en las células infectadas por el VRSH podría facilitar la replicación del virus y su persistencia al disminuir la respuesta antiviral y la apoptosis (Lim et al., 2018).

3. Empleo de siRNAs como moléculas para modular la respuesta inmune innata y la replicación viral

Actualmente no hay ninguna vacuna aprobada o tratamiento terapéutico efectivo frente al VRSH, aunque se están haciendo grandes esfuerzos en ambos campos. Tanto la replicación viral, como una respuesta inmune inadecuada, parecen influir en el desarrollo de las patologías más graves asociadas a la infección por el VRSH, tales como la bronquiolitis o neumonía (Collins and Graham, 2008). Por tanto, actuar frente a estos dos aspectos de la infección podría facilitar el aclaramiento del virus y atenuar los síntomas de la enfermedad.

En la búsqueda de nuevos tratamientos frente al VRSH, se ha explorado la idea de inhibir la replicación del virus y la respuesta inmune innata mediante el empleo de diferentes siRNAs dirigidos contra proteínas celulares y/o virales. En un estudio pionero, Khaitov et al. demostraron que la administración combinada de siRNAs frente al VRSH e IL-4 reducía la inflamación en un modelo de exacerbación del asma, en el que los ratones se sensibilizaron con ovoalbúmina antes de infectarlos con el VRSH (Khaitov et al., 2014). Nuestro estudio se ha centrado en las

células epiteliales respiratorias, que son las principales dianas de la infección viral, y donde se inicia la respuesta inmune. Estas células secretan citoquinas proinflamatorias y quimioquinas que promueven la inflamación del tejido infectado y contribuyen a la inducción de la posterior respuesta inmune adaptativa. Por tanto, en la misma célula epitelial respiratoria se pueden modular la replicación viral y la respuesta inmune innata temprana al mismo tiempo. Para ello se utilizaron siRNAs que silenciaban la expresión de genes celulares implicados en las rutas de señalización inmune intracelular inducidas por el VRSH por un lado, o siRNAs frente a genes virales por otro. Además, se diseñaron siRNAs biespecíficos que silenciaban la expresión de ambos genes a la vez, celulares y virales. Para el diseño de los siRNAs biespecíficos, se alinearon las secuencias de los mRNAs de algunas de esas proteínas celulares con el genoma del VRSH (en polaridad positiva). Este alineamiento mostró que había pequeños segmentos altamente conservados entre ellos, que podrían ser diana de siRNAs biespecíficos. Aunque se diseñaron varios siRNAs biespecíficos, finalmente sólo funcionaron dos: uno que silenciaba a la vez TRIM25 y la proteína F del virus (TRIM25/VRSH-F) y otro que silenciaba RIG-I y la nucleoproteína del virus (RIG-I/VRSH-N).

Los siRNAs biespecíficos, y la combinación de los correspondientes siRNAs monoespecíficos frente a genes virales y celulares, redujeron la producción de virus y la respuesta inflamatoria/antiviral en las células infectadas. Sin embargo, encontramos que también los siRNAs monoespecíficos frente a los genes virales redujeron la respuesta innata intracelular, además de la replicación del virus. No obstante, este efecto sobre la respuesta inmune fue diferente según el gen viral silenciado. Estas diferencias podrían estar relacionadas con el papel de las correspondientes proteínas virales en el ciclo de replicación viral, como ha sido sugerido por Bitko y Barik (Bitko and Barik, 2001). Así, la inhibición de la expresión de la proteína N, involucrada en los procesos de replicación/transcripción del virus, redujo la replicación viral y, por tanto, la cantidad total de RNAs virales. Puesto que los RNAs actúan como principales dianas de los PRRs (Gurtler and Bowie, 2013), el silenciamiento de la N resultó en una drástica reducción de la respuesta inmune innata celular. Por el contrario, el silenciamiento de la proteína F del virus, la cual no está involucrada en la replicación/transcripción, no dio lugar a un descenso generalizado del RNA viral, y por tanto, la señalización intracelular mediada por los

PRRs continuó produciéndose. Estos resultados indican que la inhibición de distintos genes del VRSH permitiría generar una respuesta inflamatoria y antiviral diferente sin comprometer la reducción de los títulos virales. Nuestros resultados están en línea con los resultados de un artículo publicado recientemente, en el cual la respuesta de interferón inducida por el VRSH en células epiteliales se pudo modular mediante el tratamiento con diferentes moléculas inhibidoras de la polimerasa viral (L) (McCutcheon et al., 2016). Así, la administración de uno de estos inhibidores dio lugar a un aumento en la producción de RNAs virales abortivos, lo que aumentó la expresión de genes estimulados por interferón (ISG), pero disminuyó la producción de partículas infectivas del virus. Por el contrario, otro inhibidor resultó en la supresión de la síntesis de RNA viral, lo que dio lugar a la atenuación de la respuesta inmune mediada por RIG-I (McCutcheon et al., 2016).

La respuesta inmune frente al VRSH es compleja y algunos factores virales y del hospedador se han relacionado con la inmunopatología del VRSH (Collins and Graham, 2008). La inmunidad frente al VRSH incluye anticuerpos neutralizantes principalmente frente a la proteína F (Collins, 2013). Sin embargo, no está claro si una potente respuesta inmune innata temprana es beneficiosa o no para prevenir la infección grave por el VRSH (Piedra et al., 2017). Asimismo, es probable que algunos aspectos de la respuesta inmune sean beneficiosos, y otros no, lo que puede depender además del paciente. Por tanto, aunque nosotros nos hemos centrado en reducir la respuesta inmune temprana frente al VRSH, es posible que, en algunos casos, una fuerte respuesta inmune sea necesaria para aclarar el virus. En este caso, sería adecuado que el silenciamiento de genes virales no redujese significativamente esta respuesta inmune, y que además se mantuviesen altos niveles de expresión de las glicoproteínas virales F y G, principales dianas de los anticuerpos neutralizantes. Como se muestra en el trabajo, el silenciamiento de la expresión de la proteína N redujo drásticamente la respuesta inmune innata y también los niveles de expresión de las proteínas F y G. Por el contrario, el silenciamiento de la F tuvo un moderado efecto sobre la respuesta inmune innata pero redujo fuertemente la expresión de la proteína F, principal diana de los anticuerpos neutralizantes. Los estudios previos que han utilizado siRNAs frente al VRSH se han centrado en las proteínas implicadas en replicación y transcripción (N, P y M2-II) (DeVincenzo et al., 2008, Alvarez et al., 2009, Malekshahi et al., 2016,

Bitko et al., 2005, Chin et al., 2016), o la proteína F (Malekshahi et al., 2016, Vig et al., 2009). En todos los casos, se ha informado que los títulos virales disminuyen substancialmente. Sin embargo, en la mayoría de los trabajos no ha sido evaluado su efecto sobre la respuesta inmune, lo cual impide una comparación directa con nuestros resultados. En cualquier caso, sería interesante silenciar otros genes virales que no estuviesen implicados en la replicación/transcripción o en la inducción de anticuerpos neutralizantes, como la proteína de la matriz (M). El silenciamiento de la M podría permitir, tanto la replicación/transcripción del virus, como la inducción de anticuerpos neutralizantes. Una ventaja adicional de la proteína M del virus es que es una de las proteínas más conservadas (Tan et al., 2013), por lo que sería más fácil diseñar un siRNA efectivo frente a la mayoría de los aislados virales. Otra aproximación podría ser silenciar la expresión de las proteínas no estructurales del virus que antagonizan la respuesta a IFN del hospedador. Por ejemplo, ha sido descrito que un siRNA frente al gen *NS1* del VRSH redujo los niveles de replicación del virus en células A549 y en ratones, mientras que aumentó la expresión de *IFN- β* (Zhang et al., 2005). Sin embargo, en este caso la reducción en la producción de virus podría ser debida al aumento de la respuesta inmune innata más que al silenciamiento directo del RNA viral (Zhang et al., 2005).

Los siRNAs presentan varias ventajas como potenciales tratamientos frente a diferentes patógenos y enfermedades (Potaczek et al., 2016, Ballarín-González et al., 2013). Son baratos, fáciles de producir, pueden ser liofilizados para aumentar su estabilidad, y son altamente específicos. Una ventaja adicional, en el caso de virus respiratorios, es que pueden administrarse de forma local en el tracto respiratorio. Además, pueden aplicarse fácilmente como combinaciones de siRNAs contra diferentes regiones del mismo o diferente gen viral. Esto aumentaría la eficacia del tratamiento y extendería el espectro de genotipos susceptibles, a la vez que limitaría la emergencia de variantes resistentes al tratamiento (Barik and Lu, 2015). Asimismo, los siRNAs pueden ser fácilmente diseñados contra casi cualquier gen viral o celular. Esto ofrece un amplio abanico de alternativas para tratar infecciones virales, o de otro tipo, a la vez que permitiría modular de forma fina la respuesta inmune innata asociada.

A pesar de las numerosas ventajas de emplear siRNAs como tratamiento, los efectos “*off-target*” de los siRNAs siguen siendo un problema importante a tener en

cuenta. Los ensayos de toxicidad de los siRNAs empleados en este estudio excluyeron un efecto sustancial sobre la viabilidad celular. Además, estos siRNAs no parecen inducir una respuesta de interferón significativa que dé lugar a una inhibición generalizada de la traducción puesto que: (i) En el caso de las células transfectadas con los siRNAs control, TRIM25 y RIG-I, los niveles de las proteínas virales incrementan de 24 a 48 hpi. (ii) Los siRNAs VRSH-F y TRIM25/VRSH-F solamente inhibieron los niveles de expresión de la proteína F, pero no la acumulación de otras proteínas virales. (iii) La actividad antiviral de VRSH-N no parece estar implicada en la respuesta mediada por IFN (Alvarez et al., 2009). Sin embargo, es difícil descartar completamente cualquier efecto “*off-target*” de los siRNAs sobre los genes celulares, puesto que la hebra guía del siRNA podría silenciar mRNAs celulares no deseados por un mecanismo similar al de los microRNAs, en el cual solamente se requiere una complementariedad parcial que principalmente está mediada por la región semilla (nucleótidos 2 – 8, Figura 22) (Kamola et al., 2015).

Debido a que las rutas intracelulares que dan lugar a la respuesta inmune antiviral están finamente moduladas, tanto por reguladores positivos como negativos, uno puede imaginarse diferentes combinaciones de siRNAs frente a genes virales o celulares para inhibir el crecimiento del virus y reducir o potenciar la respuesta inmune inflamatoria y antiviral, según sea necesario. Sin embargo, esta versatilidad probablemente requerirá del uso de combinaciones de siRNAs contra genes virales y celulares, más que siRNAs biespecíficos, puesto que estos últimos están restringidos por la existencia de secuencias conservadas entre ambos tipos de genes.

Finalmente, hemos comprobado que los siRNAs frente al VRSH son muy efectivos cuando son administrados antes de la infección (Zhang et al., 2005, Alvarez et al., 2009, Bitko et al., 2005), pero también funcionan cuando se administran después de la infección, lo cual sugiere que podrían ser empleados tanto en tratamientos profilácticos, como terapéuticos.

CONCLUSIONS & CONCLUSIONES

CONCLUSIONS

1. The RIG-I receptor plays a key role in the induction of the inflammatory/antiviral gene expression in A549 cells infected by HRSV.
2. HRSV induces the expression of high levels of A20, a master negative regulator of inflammation, at late times post-infection.
3. Downregulation of A20 or A20-interacting proteins (TAX1BP1 and ABIN1) by specific siRNAs enhances intracellular immune response and decreases HRSV virus production.
4. The antiviral/inflammatory response and infection-related signaling pathways are upregulated in A20 knockout cells, while HRSV production is impaired.
5. Downregulation of A20 or A20-interacting proteins increase cell apoptosis in HRSV-infected cells.
6. Small interfering RNAs targeting viral fusion (F) mRNA or nucleoprotein (N) mRNA inhibit virus growth to a similar extent. However, silencing N, but not F, leads to a generalized inhibition of HRSV RNA and proteins. Furthermore, targeting HRSV N with siRNAs reduces the cellular immune response drastically while HRSV F silencing has only a moderate effect.
7. The alignment of the HRSV genome with innate immune genes allows the design of bispecific siRNAs that silence cellular and viral genes at the same time. These siRNAs reduce both HRSV replication and the associated early innate immune response.

CONCLUSIONES

1. El receptor RIG-I juega un papel clave en la inducción de la expresión de genes de respuesta inflamatoria/antiviral en células A549 infectadas por el VRSH.
2. El VRSH induce altos niveles de A20, un regulador negativo de la inflamación, a tiempos tardíos post-infección.
3. El silenciamiento de A20 o de las proteínas que interaccionan con ella (TAX1BP1 y ABIN1), por medio de siRNAs, aumenta la respuesta inmune intracelular y disminuye la producción del VRSH.
4. La respuesta inflamatoria/antiviral y las rutas de señalización relacionadas con infección aumentan en las líneas celulares KO para A20, mientras que la producción de virus disminuye.
5. El silenciamiento de A20 o de las proteínas que interaccionan con ella incrementan los niveles de apoptosis en las células infectadas por el VRSH.
6. Los siRNAs dirigidos frente al mRNA de la proteína de fusión (F) del virus o frente al mRNA de la nucleoproteína (N) inhiben la producción de virus de forma similar. Sin embargo, el silenciamiento de la N, pero no de la F, produce una inhibición generalizada de la expresión del RNA y proteínas del VRSH. Además, el silenciamiento de la N reduce drásticamente la respuesta inmune celular mientras que el silenciamiento de la F solamente tiene un efecto moderado.
7. El alineamiento del genoma del VRSH con los genes de respuesta inmune innata permite el diseño de siRNAs biespecíficos que silencian genes virales y celulares al mismo tiempo. Estos siRNAs reducen ambos, la replicación del VRSH y la respuesta inmune innata temprana asociada.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- AL-SHEHRI, M. A., SADEQ, A. & QULI, K. 2005. Bronchiolitis in Abha, Southwest Saudi Arabia: viral etiology and predictors for hospital admission. *West Afr J Med*, 24, 299-304.
- ALAGIA, A. & ERITJA, R. 2016. siRNA and RNAi optimization. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 7, 316-29.
- ALVAREZ, A. E., MARSON, F. A., BERTUZZO, C. S., ARNS, C. W. & RIBEIRO, J. D. 2013. Epidemiological and genetic characteristics associated with the severity of acute viral bronchiolitis by respiratory syncytial virus. *J Pediatr (Rio J)*, 89, 531-43.
- ALVAREZ, R., ELBASHIR, S., BORLAND, T., TOUDJARSKA, I., HADWIGER, P., JOHN, M., ROEHL, I., MORSKAYA, S. S., MARTINELLO, R., KAHN, J., VAN RANST, M., TRIPP, R. A., DEVINCENZO, J. P., PANDEY, R., MAIER, M., NECHEV, L., MANOHARAN, M., KOTELIANSKI, V. & MEYERS, R. 2009. RNA interference-mediated silencing of the respiratory syncytial virus nucleocapsid defines a potent antiviral strategy. *Antimicrob Agents Chemother*, 53, 3952-62.
- AMARASINGHE, G. K., AYLLÓN, M. A., BÀO, Y., BASLER, C. F., BAVARI, S., BLASDELL, K. R., BRIESE, T., BROWN, P. A., BUKREYEV, A., BALKEMA-BUSCHMANN, A., BUCHHOLZ, U. J., CHABI-JESUS, C., CHANDRAN, K., CHIAPPONI, C., CROZIER, I., DE SWART, R. L., DIETZGEN, R. G., DOLNIK, O., DREXLER, J. F., DÜRRWALD, R., DUNDON, W. G., DUPREX, W. P., DYE, J. M., EASTON, A. J., FOOKS, A. R., FORMENTY, P. B. H., FOUCHIER, R. A. M., FREITAS-ASTÚA, J., GRIFFITHS, A., HEWSON, R., HORIE, M., HYNDMAN, T. H., JIĀNG, D., KITAJIMA, E. W., KOBINGER, G. P., KONDŌ, H., KURATH, G., KUZMIN, I. V., LAMB, R. A., LAVAZZA, A., LEE, B., LELLI, D., LEROY, E. M., LĪ, J., MAES, P., MARZANO, S. L., MORENO, A., MÜHLBERGER, E., NETESOV, S. V., NOWOTNY, N., NYLUND, A., ØKLAND, A. L., PALACIOS, G., PÁLYI, B., PAWĘSKA, J. T., PAYNE, S. L., PROSPERI, A., RAMOS-GONZÁLEZ, P. L., RIMA, B. K., ROTA, P., RUBBENSTROTH, D., SHĪ, M., SIMMONDS, P., SMITHER, S. J., SOZZI, E., SPANN, K., STENGLEIN, M. D., STONE, D. M., TAKADA, A., TESH, R. B., TOMONAGA, K., TORDO, N., TOWNER, J. S., VAN DEN HOOGEN, B., VASILAKIS, N., WAHL, V., WALKER, P. J., WANG, L. F., WHITFIELD, A. E., WILLIAMS, J. V., ZERBINI, F. M., ZHĀNG, T., ZHANG, Y. Z. & KUHN, J. H. 2019. Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2019. *Arch Virol*.
- ANDERS, S. & HUBER, W. 2010. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol*, 11, R106.
- ARAUJO, G. C., SILVA, R. H., SCOTT, L. P., ARAUJO, A. S., SOUZA, F. P. & DE OLIVEIRA, R. J. 2016. Structure and functional dynamics characterization of the ion channel of the human respiratory syncytial virus (hRSV) small hydrophobic protein (SH) transmembrane domain by combining molecular dynamics with excited normal modes. *J Mol Model*, 22, 286.
- ARGUELLO, M., PAZ, S., FERRAN, C., MOLL, H. P. & HISCOTT, J. 2014. Anti-viral tetris: modulation of the innate anti-viral immune response by A20. *Adv Exp Med Biol*, 809, 49-64.
- ARIMOTO, K., TAKAHASHI, H., HISHIKI, T., KONISHI, H., FUJITA, T. & SHIMOTOHNO, K. 2007. Negative regulation of the RIG-I signaling by the ubiquitin ligase RNF125. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 7500-5.
- ASLANZADEH, J., ZHENG, X., LI, H., TETREAULT, J., RATKIEWICZ, I., MENG, S., HAMILTON, P. & TANG, Y. W. 2008. Prospective evaluation of rapid antigen tests for diagnosis of respiratory syncytial virus and human metapneumovirus infections. *J Clin Microbiol*, 46, 1682-5.
- BAKKER, S. E., DUQUERROY, S., GALLOUX, M., LONEY, C., CONNER, E., ELÉOUËT, J. F., REY, F. A. & BHELLA, D. 2013. The respiratory syncytial virus nucleoprotein-RNA complex forms a left-handed helical nucleocapsid. *J Gen Virol*, 94, 1734-8.
- BALLARÍN-GONZÁLEZ, B., THOMSEN, T. B. & HOWARD, K. A. 2013. Clinical translation of RNAi-based treatments for respiratory diseases. *Drug Deliv Transl Res*, 3, 84-99.
- BARIK, S. & LU, P. 2015. Therapy of respiratory viral infections with intranasal siRNAs. *Methods Mol Biol*, 1218, 251-62.

- BEELER, J. A. & VAN WYKE COELINGH, K. 1989. Neutralization epitopes of the F glycoprotein of respiratory syncytial virus: effect of mutation upon fusion function. *J Virol*, 63, 2941-50.
- BERMINGHAM, A. & COLLINS, P. L. 1999. The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 11259-64.
- BILLINGS, J. L., HERTZ, M. I., SAVIK, K. & WENDT, C. H. 2002. Respiratory viruses and chronic rejection in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant*, 21, 559-66.
- BITKO, V. & BARIK, S. 2001. Phenotypic silencing of cytoplasmic genes using sequence-specific double-stranded short interfering RNA and its application in the reverse genetics of wild type negative-strand RNA viruses. *BMC Microbiol*, 1, 34.
- BITKO, V., MUSIYENKO, A., SHULYAYEVA, O. & BARIK, S. 2005. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat Med*, 11, 50-5.
- BITKO, V., SHULYAYEVA, O., MAZUMDER, B., MUSIYENKO, A., RAMASWAMY, M., LOOK, D. C. & BARIK, S. 2007. Nonstructural proteins of respiratory syncytial virus suppress premature apoptosis by an NF-kappaB-dependent, interferon-independent mechanism and facilitate virus growth. *J Virol*, 81, 1786-95.
- BLOEMERS, B. L., VAN FURTH, A. M., WEIJERMAN, M. E., GEMKE, R. J., BROERS, C. J., VAN DEN ENDE, K., KIMPEN, J. L., STRENGERS, J. L. & BONT, L. J. 2007. Down syndrome: a novel risk factor for respiratory syncytial virus bronchiolitis--a prospective birth-cohort study. *Pediatrics*, 120, e1076-81.
- BLOOM-FESHBACH, K., ALONSO, W. J., CHARU, V., TAMERUS, J., SIMONSEN, L., MILLER, M. A. & VIBOUD, C. 2013. Latitudinal variations in seasonal activity of influenza and respiratory syncytial virus (RSV): a global comparative review. *PLoS One*, 8, e54445.
- BLOUNT, R. E., MORRIS, J. A. & SAVAGE, R. E. 1956. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc Soc Exp Biol Med*, 92, 544-9.
- BOLGER, A. M., LOHSE, M. & USADEL, B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30, 2114-20.
- BONFANTI, J. F. & ROYMANS, D. 2009. Prospects for the development of fusion inhibitors to treat human respiratory syncytial virus infection. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 12, 479-87.
- BOSANAC, I., WERTZ, I. E., PAN, B., YU, C., KUSAM, S., LAM, C., PHU, L., PHUNG, Q., MAURER, B., ARNOTT, D., KIRKPATRICK, D. S., DIXIT, V. M. & HYMOWITZ, S. G. 2010. Ubiquitin binding to A20 ZnF4 is required for modulation of NF-kB signaling. *Mol Cell*, 40, 548-57.
- BRADLEY, J. P., BACHARIER, L. B., BONFIGLIO, J., SCHECHTMAN, K. B., STRUNK, R., STORCH, G. & CASTRO, M. 2005. Severity of respiratory syncytial virus bronchiolitis is affected by cigarette smoke exposure and atopy. *Pediatrics*, 115, e7-14.
- BRANDENBURG, A. H., GROEN, J., VAN STEENSEL-MOLL, H. A., CLAAS, E. C., ROTHBARTH, P. H., NEIJENS, H. J. & OSTERHAUS, A. D. 1997. Respiratory syncytial virus specific serum antibodies in infants under six months of age: limited serological response upon infection. *J Med Virol*, 52, 97-104.
- BUKREYEV, A., MURPHY, B. R. & COLLINS, P. L. 2000. Respiratory syncytial virus can tolerate an intergenic sequence of at least 160 nucleotides with little effect on transcription or replication in vitro and in vivo. *J Virol*, 74, 11017-26.
- CALVERLEY, P. M., RABE, K. F., GOEHRING, U. M., KRISTIANSEN, S., FABBRI, L. M., MARTINEZ, F. J., GROUPS, M.-. & STUDY, M.-. 2009. Roflumilast in symptomatic chronic obstructive pulmonary disease: two randomised clinical trials. *Lancet*, 374, 685-94.
- CARBONELL-ESTRANY, X., SIMÕES, E. A., DAGAN, R., HALL, C. B., HARRIS, B., HULTQUIST, M., CONNOR, E. M., LOSONSKY, G. A. & GROUP, M. S. 2010. Motavizumab for prophylaxis of respiratory syncytial virus in high-risk children: a noninferiority trial. *Pediatrics*, 125, e35-51.
- CARROLL, K. N., GEBRETSADIK, T., GRIFFIN, M. R., DUPONT, W. D., MITCHEL, E. F., WU, P., ENRIQUEZ, R. & HARTERT, T. V. 2007. Maternal asthma and maternal smoking are associated with increased risk of bronchiolitis during infancy. *Pediatrics*, 119, 1104-12.

- CASTANIER, C., ZEMIRLI, N., PORTIER, A., GARCIN, D., BIDERRE, N., VAZQUEZ, A. & ARNOULT, D. 2012. MAVS ubiquitination by the E3 ligase TRIM25 and degradation by the proteasome is involved in type I interferon production after activation of the antiviral RIG-I-like receptors. *BMC Biol*, 10, 44.
- CATRYSSE, L., VEREECKE, L., BEYAERT, R. & VAN LOO, G. 2014. A20 in inflammation and autoimmunity. *Trends Immunol*, 35, 22-31.
- CÉSPÉDES, P. F., BUENO, S. M., RAMÍREZ, B. A., GOMEZ, R. S., RIQUELME, S. A., PALAVECINO, C. E., MACKERN-OBERTI, J. P., MORA, J. E., DEPOIL, D., SACRISTÁN, C., CAMMER, M., CRENEGUY, A., NGUYEN, T. H., RIEDEL, C. A., DUSTIN, M. L. & KALERGIS, A. M. 2014. Surface expression of the hRSV nucleoprotein impairs immunological synapse formation with T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, E3214-23.
- COLLINS, P. L. & KARRON, R. A. 2013. Respiratory syncytial virus and metapneumovirus. In *Fields Virology: Sixth Edition*. Wolters Lower Health Addis (ESP).
- COLLINS, P. L., DICKENS, L. E., BUCKLER-WHITE, A., OLMSTED, R. A., SPRIGGS, M. K., CAMARGO, E. & COELINGH, K. V. 1986. Nucleotide sequences for the gene junctions of human respiratory syncytial virus reveal distinctive features of intergenic structure and gene order. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 4594-8.
- COLLINS, P. L., FEARN, R. & GRAHAM, B. S. 2013. Respiratory syncytial virus: virology, reverse genetics, and pathogenesis of disease. *Curr Top Microbiol Immunol*, 372, 3-38.
- COLLINS, P. L. & GRAHAM, B. S. 2008. Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis. *J Virol*, 82, 2040-55.
- COLLINS, P. L., HILL, M. G., CAMARGO, E., GROSFELD, H., CHANOCK, R. M. & MURPHY, B. R. 1995. Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 11563-7.
- COLLINS, P. L., HILL, M. G., CRISTINA, J. & GROSFELD, H. 1996. Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negative-strand RNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 81-5.
- COLLINS, P. L., OLMSTED, R. A., SPRIGGS, M. K., JOHNSON, P. R. & BUCKLER-WHITE, A. J. 1987. Gene overlap and site-specific attenuation of transcription of the viral polymerase L gene of human respiratory syncytial virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 5134-8.
- CHANOCK, R. & FINBERG, L. 1957. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). II. Epidemiologic aspects of infection in infants and young children. *Am J Hyg*, 66, 291-300.
- CHANOCK, R., ROIZMAN, B. & MYERS, R. 1957. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties and characterization. *Am J Hyg*, 66, 281-90.
- CHAPMAN, J., ABBOTT, E., ALBER, D. G., BAXTER, R. C., BITHELL, S. K., HENDERSON, E. A., CARTER, M. C., CHAMBERS, P., CHUBB, A., COCKERILL, G. S., COLLINS, P. L., DOWDELL, V. C., KEEGAN, S. J., KELSEY, R. D., LOCKYER, M. J., LUONGO, C., NAJARRO, P., PICKLES, R. J., SIMMONDS, M., TAYLOR, D., TYMS, S., WILSON, L. J. & POWELL, K. L. 2007. RSV604, a novel inhibitor of respiratory syncytial virus replication. *Antimicrob Agents Chemother*, 51, 3346-53.
- CHEN, M. D., VAZQUEZ, M., BUONOCORE, L. & KAHN, J. S. 2000. Conservation of the respiratory syncytial virus SH gene. *J Infect Dis*, 182, 1228-33.
- CHIN, V. K., ATIKA AZIZ, N. A., HUDU, S. A., HARMAL, N. S., SYAHRILNIZAM, A., JALILIAN, F. A. & ZAMBERI, S. 2016. Design and validation of small interfering RNA on respiratory syncytial virus M2-2 gene: A potential approach in RNA interference on viral replication. *J Virol Methods*, 236, 117-125.
- CHIRKOVA, T., LIN, S., OOMENS, A. G., GASTON, K. A., BOYOGLU-BARNUM, S., MENG, J., STOBART, C. C., COTTON, C. U., HARTERT, T. V., MOORE, M. L., ZIADY, A. G. & ANDERSON, L. J. 2015.

- CX3CR1 is an important surface molecule for respiratory syncytial virus infection in human airway epithelial cells. *J Gen Virol*, 96, 2543-56.
- CHOI, Y. B., SHEMBADE, N., PARVATIYAR, K., BALACHANDRAN, S. & HARHAJ, E. W. 2017. TAX1BP1 Restrains Virus-Induced Apoptosis by Facilitating Itch-Mediated Degradation of the Mitochondrial Adaptor MAVS. *Mol Cell Biol*, 37.
- CHOUDHARY, S., BOLDOGH, S., GAROFALO, R., JAMALUDDIN, M. & BRASIER, A. R. 2005. Respiratory syncytial virus influences NF-kappaB-dependent gene expression through a novel pathway involving MAP3K14/NIK expression and nuclear complex formation with NF-kappaB2. *J Virol*, 79, 8948-59.
- CHU, H. Y. & ENGLUND, J. A. 2013. Respiratory syncytial virus disease: prevention and treatment. *Curr Top Microbiol Immunol*, 372, 235-58.
- CHU, H. Y., STEINHOFF, M. C., MAGARET, A., ZAMAN, K., ROY, E., LANGDON, G., FORMICA, M. A., WALSH, E. E. & ENGLUND, J. A. 2014. Respiratory syncytial virus transplacental antibody transfer and kinetics in mother-infant pairs in Bangladesh. *J Infect Dis*, 210, 1582-9.
- DANIEL, S., ARVELO, M. B., PATEL, V. I., LONGO, C. R., SHRIKHANDE, G., SHUKRI, T., MAHIOU, J., SUN, D. W., MOTTLEY, C., GREY, S. T. & FERRAN, C. 2004. A20 protects endothelial cells from TNF-, Fas-, and NK-mediated cell death by inhibiting caspase 8 activation. *Blood*, 104, 2376-84.
- DAVIS, M. E. & GACK, M. U. 2015. Ubiquitination in the antiviral immune response. *Virology*, 479-480, 52-65.
- DE VALCK, D., JIN, D. Y., HEYNINCK, K., VAN DE CRAEN, M., CONTRERAS, R., FIER, W., JEANG, K. T. & BEYAERT, R. 1999. The zinc finger protein A20 interacts with a novel anti-apoptotic protein which is cleaved by specific caspases. *Oncogene*, 18, 4182-90.
- DEVINCENZO, J., CEHELSKY, J. E., ALVAREZ, R., ELBASHIR, S., HARBORTH, J., TOUDJARSKA, I., NECHEV, L., MURUGAIAH, V., VAN VLIET, A., VAISHNAW, A. K. & MEYERS, R. 2008. Evaluation of the safety, tolerability and pharmacokinetics of ALN-RSV01, a novel RNAi antiviral therapeutic directed against respiratory syncytial virus (RSV). *Antiviral Res*, 77, 225-31.
- DEVINCENZO, J., LAMBKIN-WILLIAMS, R., WILKINSON, T., CEHELSKY, J., NOCHUR, S., WALSH, E., MEYERS, R., GOLLOB, J. & VAISHNAW, A. 2010. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of an RNAi-based therapy directed against respiratory syncytial virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 8800-5.
- DEVINCENZO, J. P. 2008. RNA interference strategies as therapy for respiratory viral infections. *Pediatr Infect Dis J*, 27, S118-22.
- DEVINCENZO, J. P. 2012. The promise, pitfalls and progress of RNA-interference-based antiviral therapy for respiratory viruses. *Antiviral Therapy*, 17, 213-225.
- DRABER, P., KUPKA, S., REICHERT, M., DRABEROVA, H., LAFONT, E., DE MIGUEL, D., SPILGIES, L., SURINOVA, S., TARABORRELLI, L., HARTWIG, T., RIESER, E., MARTINO, L., RITTINGER, K. & WALCZAK, H. 2015. LUBAC-Recruited CYLD and A20 Regulate Gene Activation and Cell Death by Exerting Opposing Effects on Linear Ubiquitin in Signaling Complexes. *Cell Rep*, 13, 2258-72.
- DU, J., YUAN, Z., MA, Z., SONG, J., XIE, X. & CHEN, Y. 2014. KEGG-PATH: Kyoto encyclopedia of genes and genomes-based pathway analysis using a path analysis model. *Mol Biosyst*, 10, 2441-7.
- ESPOSITO, S., SCARSELLI, E., LELI, M., SCALA, A., VITELLI, A., CAPONE, S., FORNILI, M., BIGANZOLI, E., ORENTI, A., NICOSIA, A., CORTESE, R. & PRINCIPI, N. 2016. Antibody response to respiratory syncytial virus infection in children <18 months old. *Hum Vaccin Immunother*, 12, 1700-6.
- FALSEY, A. R. 2007. Respiratory syncytial virus infection in adults. *Semin Respir Crit Care Med*, 28, 171-81.
- FALSEY, A. R., HENNESSEY, P. A., FORMICA, M. A., COX, C. & WALSH, E. E. 2005. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *N Engl J Med*, 352, 1749-59.
- FEARNS, R. & COLLINS, P. L. 1999. Model for polymerase access to the overlapped L gene of respiratory syncytial virus. *J Virol*, 73, 388-97.

- FEARNS, R., COLLINS, P. L. & PEEPLES, M. E. 2000. Functional analysis of the genomic and antigenomic promoters of human respiratory syncytial virus. *J Virol*, 74, 6006-14.
- FELTES, T. F., SONDHEIMER, H. M., TULLOH, R. M., HARRIS, B. S., JENSEN, K. M., LOSONSKY, G. A., GRIFFIN, M. P. & GROUP, M. C. S. 2011. A randomized controlled trial of motavizumab versus palivizumab for the prophylaxis of serious respiratory syncytial virus disease in children with hemodynamically significant congenital heart disease. *Pediatr Res*, 70, 186-91.
- FENG, W., SUN, X., SHI, N., ZHANG, M., GUAN, Z. & DUAN, M. 2017. Influenza A virus NS1 protein induced A20 contributes to viral replication by suppressing interferon-induced antiviral response. *Biochem Biophys Res Commun*, 482, 1107-1113.
- FERNÁNDEZ, P., TRENHOLME, A., ABARCA, K., GRIFFIN, M. P., HULTQUIST, M., HARRIS, B., LOSONSKY, G. A. & GROUP, M. S. 2010. A phase 2, randomized, double-blind safety and pharmacokinetic assessment of respiratory syncytial virus (RSV) prophylaxis with motavizumab and palivizumab administered in the same season. *BMC Pediatr*, 10, 38.
- FRIEDMAN, C. S., O'DONNELL, M. A., LEGARDA-ADDISON, D., NG, A., CARDENAS, W. B., YOUNT, J. S., MORAN, T. M., BASLER, C. F., KOMURO, A., HORVATH, C. M., XAVIER, R. & TING, A. T. 2008. The tumour suppressor CYLD is a negative regulator of RIG-I-mediated antiviral response. *EMBO Rep*, 9, 930-6.
- FUENTES, S., TRAN, K. C., LUTHRA, P., TENG, M. N. & HE, B. 2007. Function of the respiratory syncytial virus small hydrophobic protein. *J Virol*, 81, 8361-6.
- GACK, M. U., SHIN, Y. C., JOO, C. H., URANO, T., LIANG, C., SUN, L., TAKEUCHI, O., AKIRA, S., CHEN, Z., INOUE, S. & JUNG, J. U. 2007. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature*, 446, 916-920.
- GAN, S. W., TAN, E., LIN, X., YU, D., WANG, J., TAN, G. M., VARARATTANAVECH, A., YEO, C. Y., SOON, C. H., SOONG, T. W., PERVUSHIN, K. & TORRES, J. 2012. The small hydrophobic protein of the human respiratory syncytial virus forms pentameric ion channels. *J Biol Chem*, 287, 24671-89.
- GAO, D., YANG, Y. K., WANG, R. P., ZHOU, X., DIAO, F. C., LI, M. D., ZHAI, Z. H., JIANG, Z. F. & CHEN, D. Y. 2009. REUL is a novel E3 ubiquitin ligase and stimulator of retinoic-acid-inducible gene-I. *PLoS One*, 4, e5760.
- GAO, J., HUO, L., SUN, X., LIU, M., LI, D., DONG, J. T. & ZHOU, J. 2008. The tumor suppressor CYLD regulates microtubule dynamics and plays a role in cell migration. *J Biol Chem*, 283, 8802-9.
- GARCÍA-BARRENO, B., PALOMO, C., PEÑAS, C., DELGADO, T., PEREZ-BREÑA, P. & MELERO, J. A. 1989. Marked differences in the antigenic structure of human respiratory syncytial virus F and G glycoproteins. *J Virol*, 63, 925-32.
- GARCÍA GARCÍA, M. L., ORDOBÁS GABIN, M., CALVO REYA, C., GONZÁLEZ ALVAREZ, M., AGUILAR RUIZ, J., ARREGUI SIERRA, A. & PÉREZ BREÑA, P. 2001. [Viral infection of the lower respiratory tract in hospitalized infants: etiology, clinical features and risk factors]. *An Esp Pediatr*, 55, 101-7.
- GIL-PRIETO, R., GONZALEZ-ESCALADA, A., MARÍN-GARCÍA, P., GALLARDO-PINO, C. & GIL-DE-MIGUEL, A. 2015. Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis in Children up to 5 Years of Age in Spain: Epidemiology and Comorbidities: An Observational Study. *Medicine (Baltimore)*, 94, e831.
- GILMAN, M. S. A., LIU, C., FUNG, A., BEHERA, I., JORDAN, P., RIGAUX, P., YSEBAERT, N., TCHERNIUK, S., SOURIMANT, J., ELEOUET, J. F., SUTTO-ORTIZ, P., DECROLY, E., ROYMANS, D., JIN, Z. & MCLELLAN, J. S. 2019. Structure of the Respiratory Syncytial Virus Polymerase Complex. *Cell*, 179, 193-204 e14.
- GLEZEN, W. P., PAREDES, A., ALLISON, J. E., TABER, L. H. & FRANK, A. L. 1981. Risk of respiratory syncytial virus infection for infants from low-income families in relationship to age, sex, ethnic group, and maternal antibody level. *J Pediatr*, 98, 708-15.
- GOFF, L., TRAPNELL C. AND KELLEY D. 2013. *cummeRbund: Analysis, exploration, manipulation, and visualization of Cufflinks high throughput sequencing data. R Packag.*

version 2.14.0.

- GONZALEZ-SANZ, R., MATA, M., BERMEJO-MARTIN, J., ALVAREZ, A., CORTIJO, J., MELERO, J. A. & MARTINEZ, I. 2016. ISG15 Is Upregulated in Respiratory Syncytial Virus Infection and Reduces Virus Growth through Protein ISGylation. *J Virol*, 90, 3428-38.
- GOTTLIEB, J., ZAMORA, M. R., HODGES, T., MUSK, A. W., SOMMERWERK, U., DILLING, D., ARCASOY, S., DEVINCENZO, J., KARSTEN, V., SHAH, S., BETTENCOURT, B. R., CEHELKY, J., NOCHUR, S., GOLLOB, J., VAISHNAW, A., SIMON, A. R. & GLANVILLE, A. R. 2016. ALN-RSV01 for prevention of bronchiolitis obliterans syndrome after respiratory syncytial virus infection in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant*, 35, 213-21.
- GOULD, P. S. & EASTON, A. J. 2007. Coupled translation of the second open reading frame of M2 mRNA is sequence dependent and differs significantly within the subfamily Pneumovirinae. *J Virol*, 81, 8488-96.
- GOUYON, J. B., ROZÉ, J. C., GUILLERMET-FROMENTIN, C., GLORIEUX, I., ADAMON, L., DI MAIO, M., MILORADOVICH, T., ANGHELESCU, D., PINQUIER, D., ESCANDE, B. & ELLEAU, C. 2013. Hospitalizations for respiratory syncytial virus bronchiolitis in preterm infants at <33 weeks gestation without bronchopulmonary dysplasia: the CASTOR study. *Epidemiol Infect*, 141, 816-26.
- GRAHAM, B. S., BUNTON, L. A., WRIGHT, P. F. & KARZON, D. T. 1991. Role of T lymphocyte subsets in the pathogenesis of primary infection and rechallenge with respiratory syncytial virus in mice. *J Clin Invest*, 88, 1026-33.
- GRAHAM, B. S., JOHNSON, T. R. & PEEBLES, R. S. 2000. Immune-mediated disease pathogenesis in respiratory syncytial virus infection. *Immunopharmacology*, 48, 237-47.
- GRIMWOOD, K., COHET, C., RICH, F. J., CHENG, S., WOOD, C., REDSHAW, N., CUNNINGHAM, C. W., PEARCE, N. & KIRMAN, J. R. 2008. Risk factors for respiratory syncytial virus bronchiolitis hospital admission in New Zealand. *Epidemiol Infect*, 136, 1333-41.
- GROUP, T. I.-R. S. 1998. Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants. The IMPact-RSV Study Group. *Pediatrics*, 102, 531-7.
- GU, S. Y., KIM, Y. E., KWON, K. M., HAN, T. H. & AHN, J. H. 2014. Biphasic regulation of A20 gene expression during human cytomegalovirus infection. *Virology*, 11, 124.
- GURLER, C. & BOWIE, A. G. 2013. Innate immune detection of microbial nucleic acids. *Trends Microbiol*, 21, 413-20.
- HABIBI, M. S., JOZWIK, A., MAKRI, S., DUNNING, J., PARAS, A., DEVINCENZO, J. P., DE HAAN, C. A., WRAMMERT, J., OPENSHAW, P. J. & CHIU, C. 2015. Impaired Antibody-mediated Protection and Defective IgA B-Cell Memory in Experimental Infection of Adults with Respiratory Syncytial Virus. *Am J Respir Crit Care Med*, 191, 1040-9.
- HACKER, H., REDECKE, V., BLAGOEV, B., KRATCHMAROVA, I., HSU, L. C., WANG, G. G., KAMPS, M. P., RAZ, E., WAGNER, H., HACKER, G., MANN, M. & KARIN, M. 2006. Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature*, 439, 204-7.
- HALL, C. B., WEINBERG, G. A., IWANE, M. K., BLUMKIN, A. K., EDWARDS, K. M., STAAT, M. A., AUINGER, P., GRIFFIN, M. R., POEHLING, K. A., ERDMAN, D., GRIJALVA, C. G., ZHU, Y. & SZILAGYI, P. 2009. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *N Engl J Med*, 360, 588-98.
- HANLEY, L. L., MCGIVERN, D. R., TENG, M. N., DJANG, R., COLLINS, P. L. & FEARN, R. 2010. Roles of the respiratory syncytial virus trailer region: effects of mutations on genome production and stress granule formation. *Virology*, 406, 241-52.
- HARHAJ, E. W. & DIXIT, V. M. 2011. Deubiquitinases in the regulation of NF-kappaB signaling. *Cell Res*, 21, 22-39.
- HARMON, S. B. & WERTZ, G. W. 2002. Transcriptional termination modulated by nucleotides outside the characterized gene end sequence of respiratory syncytial virus. *Virology*, 300, 304-15.

- HAYMAN, T. J., HSU, A. C., KOLESNIK, T. B., DAGLEY, L. F., WILLEMSSEN, J., TATE, M. D., BAKER, P. J., KERSHAW, N. J., KEDZIERSKI, L., WEBB, A. I., WARK, P. A., KEDZIERSKA, K., MASTERS, S. L., BELZ, G. T., BINDER, M., HANSBRO, P. M., NICOLA, N. A. & NICHOLSON, S. E. 2019. RIPLET, and not TRIM25, is required for endogenous RIG-I-dependent antiviral responses. *Immunol Cell Biol*, 97, 840-852.
- HENDRICKS, D. A., MCINTOSH, K. & PATTERSON, J. L. 1988. Further characterization of the soluble form of the G glycoprotein of respiratory syncytial virus. *J Virol*, 62, 2228-33.
- HOGAN, A. B., ANDERSEN, R. S., DAVIS, S., MOORE, H. C., LIM, F. J., FATHIMA, P. & GLASS, K. 2016. Time series analysis of RSV and bronchiolitis seasonality in temperate and tropical Western Australia. *Epidemics*, 16, 49-55.
- HOLBERG, C. J., WRIGHT, A. L., MARTINEZ, F. D., RAY, C. G., TAUSSIG, L. M. & LEBOWITZ, M. D. 1991. Risk factors for respiratory syncytial virus-associated lower respiratory illnesses in the first year of life. *Am J Epidemiol*, 133, 1135-51.
- HU, H. & SUN, S. C. 2016. Ubiquitin signaling in immune responses. *Cell Res*, 26, 457-83.
- HUANG DA, W., SHERMAN, B. T. & LEMPICKI, R. A. 2009a. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res*, 37, 1-13.
- HUANG DA, W., SHERMAN, B. T. & LEMPICKI, R. A. 2009b. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*, 4, 44-57.
- IKEDA, F., CROSETTO, N. & DIKIC, I. 2010. What determines the specificity and outcomes of ubiquitin signaling? *Cell*, 143, 677-81.
- INSTITUTE, A. 2012. FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. .
- JARES BAGLIVO, S. & POLACK, F. P. 2019. The long road to protect infants against severe RSV lower respiratory tract illness. *F1000Res*, 8.
- JOHNSON, S., OLIVER, C., PRINCE, G. A., HEMMING, V. G., PFARR, D. S., WANG, S. C., DORMITZER, M., O'GRADY, J., KOENIG, S., TAMURA, J. K., WOODS, R., BANSAL, G., COUCHENOUR, D., TSAO, E., HALL, W. C. & YOUNG, J. F. 1997. Development of a humanized monoclonal antibody (MEDI-493) with potent in vitro and in vivo activity against respiratory syncytial virus. *J Infect Dis*, 176, 1215-24.
- JOHNSON, S. M., MCNALLY, B. A., IOANNIDIS, I., FLANO, E., TENG, M. N., OOMENS, A. G., WALSH, E. E. & PEEPLES, M. E. 2015. Respiratory Syncytial Virus Uses CX3CR1 as a Receptor on Primary Human Airway Epithelial Cultures. *PLoS Pathog*, 11, e1005318.
- KALLIOLIAS, G. D. & IVASHKIV, L. B. 2010. Overview of the biology of type I interferons. *Arthritis Res Ther*, 12 Suppl 1, S1.
- KAMOLA, P. J., NAKANO, Y., TAKAHASHI, T., WILSON, P. A. & UI-TEI, K. 2015. The siRNA Non-seed Region and Its Target Sequences Are Auxiliary Determinants of Off-Target Effects. *PLoS Comput Biol*, 11, e1004656.
- KANEHISA, M. & GOTO, S. 2000. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*, 28, 27-30.
- KAPIKIAN, A. Z., MITCHELL, R. H., CHANOCK, R. M., SHVEDOFF, R. A. & STEWART, C. E. 1969. An epidemiologic study of altered clinical reactivity to respiratory syncytial (RS) virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine. *Am J Epidemiol*, 89, 405-21.
- KARBOWSKI, M. & YOULE, R. J. 2011. Regulating mitochondrial outer membrane proteins by ubiquitination and proteasomal degradation. *Curr Opin Cell Biol*, 23, 476-82.
- KARR, C., LUMLEY, T., SCHREUDER, A., DAVIS, R., LARSON, T., RITZ, B. & KAUFMAN, J. 2007. Effects of subchronic and chronic exposure to ambient air pollutants on infant bronchiolitis. *Am J Epidemiol*, 165, 553-60.
- KHAITOV, M. R., SHILOVSKIY, I. P., NIKONOVA, A. A., SHERSHAKOVA, N. N., KAMYSHNIKOV, O. Y., BABAKHIN, A. A., ZVEREV, V. V., JOHNSTON, S. L. & KHAITOV, R. M. 2014. Small interfering RNAs targeted to interleukin-4 and respiratory syncytial virus reduce airway inflammation in a mouse model of virus-induced asthma exacerbation. *Hum Gene Ther*, 25, 642-50.

- KIM, D., PERTEA, G., TRAPNELL, C., PIMENTEL, H., KELLEY, R. & SALZBERG, S. L. 2013a. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol*, 14, R36.
- KIM, H. W., CANCHOLA, J. G., BRANDT, C. D., PYLES, G., CHANOCK, R. M., JENSEN, K. & PARROTT, R. H. 1969. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am J Epidemiol*, 89, 422-34.
- KIM, Y., KWEON, J., KIM, A., CHON, J. K., YOO, J. Y., KIM, H. J., KIM, S., LEE, C., JEONG, E., CHUNG, E., KIM, D., LEE, M. S., GO, E. M., SONG, H. J., KIM, H., CHO, N., BANG, D. & KIM, J. S. 2013b. A library of TAL effector nucleases spanning the human genome. *Nat Biotechnol*, 31, 251-8.
- KISS, G., HOLL, J. M., WILLIAMS, G. M., ALONAS, E., VANOVER, D., LIFLAND, A. W., GUDHETI, M., GUERRERO-FERREIRA, R. C., NAIR, V., YI, H., GRAHAM, B. S., SANTANGELO, P. J. & WRIGHT, E. R. 2014. Structural analysis of respiratory syncytial virus reveals the position of M2-1 between the matrix protein and the ribonucleoprotein complex. *J Virol*, 88, 7602-17.
- KOEHOORN, M., KARR, C. J., DEMERS, P. A., LENCAR, C., TAMBURIC, L. & BRAUER, M. 2008. Descriptive epidemiological features of bronchiolitis in a population-based cohort. *Pediatrics*, 122, 1196-203.
- KOHLMEIER, J. E. & WOODLAND, D. L. 2009. Immunity to respiratory viruses. *Annu Rev Immunol*, 27, 61-82.
- KUMAR, H., KAWAI, T. & AKIRA, S. 2011. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol*, 30, 16-34.
- KUO, L., GROSFELD, H., CRISTINA, J., HILL, M. G. & COLLINS, P. L. 1996. Effects of mutations in the gene-start and gene-end sequence motifs on transcription of monocistronic and dicistronic minigenomes of respiratory syncytial virus. *J Virol*, 70, 6892-901.
- KURT-JONES, E. A., POPOVA, L., KWINN, L., HAYNES, L. M., JONES, L. P., TRIPP, R. A., WALSH, E. E., FREEMAN, M. W., GOLENBOCK, D. T., ANDERSON, L. J. & FINBERG, R. W. 2000. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol*, 1, 398-401.
- KUYUCU, S., UNAL, S., KUYUCU, N. & YILGOR, E. 2004. Additive effects of dexamethasone in nebulized salbutamol or L-epinephrine treated infants with acute bronchiolitis. *Pediatr Int*, 46, 539-44.
- LAMKANFI, M. & DIXIT, V. M. 2010. Manipulation of host cell death pathways during microbial infections. *Cell Host Microbe*, 8, 44-54.
- LANGLEY, J. M., WANG, E. E., LAW, B. J., STEPHENS, D., BOUCHER, F. D., DOBSON, S., MCDONALD, J., MACDONALD, N. E., MITCHELL, I. & ROBINSON, J. L. 1997. Economic evaluation of respiratory syncytial virus infection in Canadian children: a Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada (PICNIC) study. *J Pediatr*, 131, 113-7.
- LEADER, S. & KOHLHASE, K. 2003. Recent trends in severe respiratory syncytial virus (RSV) among US infants, 1997 to 2000. *J Pediatr*, 143, S127-32.
- LEE, J., CHAN, S. T., KIM, J. Y. & OU, J. J. 2019. Hepatitis C Virus Induces the Ubiquitin-Editing Enzyme A20 via Depletion of the Transcription Factor Upstream Stimulatory Factor 1 To Support Its Replication. *MBio*, 10.
- LEGG, J. P., HUSSAIN, I. R., WARNER, J. A., JOHNSTON, S. L. & WARNER, J. O. 2003. Type 1 and type 2 cytokine imbalance in acute respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med*, 168, 633-9.
- LELAND, D. S. & GINOCCHIO, C. C. 2007. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Clin Microbiol Rev*, 20, 49-78.
- LENSCHOW, D. J., GIANNAKOPOULOS, N. V., GUNN, L. J., JOHNSTON, C., O'GUIN, A. K., SCHMIDT, R. E., LEVINE, B. & VIRGIN, H. W. T. 2005. Identification of interferon-stimulated gene 15 as an antiviral molecule during Sindbis virus infection in vivo. *J Virol*, 79, 13974-83.

- LI, M., LI, J., ZENG, R., YANG, J., LIU, J., ZHANG, Z., SONG, X., YAO, Z., MA, C., LI, W., WANG, K. & WEI, L. 2018. Respiratory Syncytial Virus Replication Is Promoted by Autophagy-Mediated Inhibition of Apoptosis. *J Virol*, 92.
- LIAO, R. S., TOMALTY, L. L., MAJURY, A. & ZOUTMAN, D. E. 2009. Comparison of viral isolation and multiplex real-time reverse transcription-PCR for confirmation of respiratory syncytial virus and influenza virus detection by antigen immunoassays. *J Clin Microbiol*, 47, 527-32.
- LIM, M. C. C., MAUBACH, G. & NAUMANN, M. 2018. NF- κ B-regulated ubiquitin-editing enzyme A20 paves the way for infection persistency. *Cell Cycle*, 17, 3-4.
- LIM, M. C. C., MAUBACH, G., SOKOLOVA, O., FEIGE, M. H., DIEZKO, R., BUCHBINDER, J., BACKERT, S., SCHLUTER, D., LAVRIK, I. N. & NAUMANN, M. 2017. Pathogen-induced ubiquitin-editing enzyme A20 bifunctionally shuts off NF-kappaB and caspase-8-dependent apoptotic cell death. *Cell Death Differ*, 24, 1621-1631.
- LIN, R., YANG, L., NAKHAEI, P., SUN, Q., SHARIF-ASKARI, E., JULKUNEN, I. & HISCOTT, J. 2006. Negative regulation of the retinoic acid-inducible gene I-induced antiviral state by the ubiquitin-editing protein A20. *J Biol Chem*, 281, 2095-103.
- LIN, Y., BRIGHT, A. C., ROTHERMEL, T. A. & HE, B. 2003. Induction of apoptosis by paramyxovirus simian virus 5 lacking a small hydrophobic gene. *J Virol*, 77, 3371-83.
- LING, Z., TRAN, K. C. & TENG, M. N. 2009. Human respiratory syncytial virus nonstructural protein NS2 antagonizes the activation of beta interferon transcription by interacting with RIG-I. *J Virol*, 83, 3734-42.
- LIU, D., DAVYDENKO, O. & LAMPSON, M. A. 2012. Polo-like kinase-1 regulates kinetochore-microtubule dynamics and spindle checkpoint silencing. *J Cell Biol*, 198, 491-9.
- LIU, P., JAMALUDDIN, M., LI, K., GAROFALO, R. P., CASOLA, A. & BRASIER, A. R. 2007. Retinoic acid-inducible gene I mediates early antiviral response and Toll-like receptor 3 expression in respiratory syncytial virus-infected airway epithelial cells. *J Virol*, 81, 1401-11.
- LIU, P., LI, K., GAROFALO, R. P. & BRASIER, A. R. 2008. Respiratory syncytial virus induces RelA release from cytoplasmic 100-kDa NF-kappa B2 complexes via a novel retinoic acid-inducible gene-I{middle dot}NF- kappa B-inducing kinase signaling pathway. *J Biol Chem*, 283, 23169-78.
- LIU, S., CHEN, J., CAI, X., WU, J., CHEN, X., WU, Y. T., SUN, L. & CHEN, Z. J. 2013. MAVS recruits multiple ubiquitin E3 ligases to activate antiviral signaling cascades. *Elife*, 2, e00785.
- LO, M. S., BRAZAS, R. M. & HOLTZMAN, M. J. 2005. Respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 mediate inhibition of Stat2 expression and alpha/beta interferon responsiveness. *J Virol*, 79, 9315-9.
- LOZANO, R., NAGHAVI, M., FOREMAN, K., LIM, S., SHIBUYA, K., ABOYANS, V., ABRAHAM, J., ADAIR, T., AGGARWAL, R., AHN, S. Y., ALVARADO, M., ANDERSON, H. R., ANDERSON, L. M., ANDREWS, K. G., ATKINSON, C., BADDOUR, L. M., BARKER-COLLO, S., BARTELS, D. H., BELL, M. L., BENJAMIN, E. J., BENNETT, D., BHALLA, K., BIKBOV, B., BIN ABDULHAK, A., BIRBECK, G., BLYTH, F., BOLLIGER, I., BOUFOUS, S., BUCELLO, C., BURCH, M., BURNEY, P., CARAPETIS, J., CHEN, H., CHOU, D., CHUGH, S. S., COFFENG, L. E., COLAN, S. D., COLQUHOUN, S., COLSON, K. E., CONDON, J., CONNOR, M. D., COOPER, L. T., CORRIERE, M., CORTINOVIS, M., DE VACCARO, K. C., COUSER, W., COWIE, B. C., CRIQUI, M. H., CROSS, M., DABHADKAR, K. C., DAHODWALA, N., DE LEO, D., DEGENHARDT, L., DELOSSANTOS, A., DENENBERG, J., DES JARLAIS, D. C., DHARMARATNE, S. D., DORSEY, E. R., DRISCOLL, T., DUBER, H., EBEL, B., ERWIN, P. J., ESPINDOLA, P., EZZATI, M., FEIGIN, V., FLAXMAN, A. D., FOROUZANFAR, M. H., FOWKES, F. G., FRANKLIN, R., FRANSEN, M., FREEMAN, M. K., GABRIEL, S. E., GAKIDOU, E., GASPARI, F., GILLUM, R. F., GONZALEZ-MEDINA, D., HALASA, Y. A., HARING, D., HARRISON, J. E., HAVMOELLER, R., HAY, R. J., HOEN, B., HOTEZ, P. J., HOY, D., JACOBSEN, K. H., JAMES, S. L., JASRASARIA, R., JAYARAMAN, S., JOHNS, N., KARTHIKEYAN, G., KASSEBAUM, N., KEREN, A., KHOO, J. P., KNOWLTON, L. M., KOBUSINGYE, O., KORANTENG, A., KRISHNAMURTHI, R., LIPNICK, M., LIPSHULTZ, S. E., OHNO, S. L., et al. 2012. Global and regional mortality from

- 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 380, 2095-128.
- LUCHSINGER, V., PIEDRA, P. A., RUIZ, M., ZUNINO, E., MARTINEZ, M. A., MACHADO, C., FASCE, R., ULLOA, M. T., FINK, M. C., LARA, P. & AVENDANO, L. F. 2012. Role of neutralizing antibodies in adults with community-acquired pneumonia by respiratory syncytial virus. *Clin Infect Dis*, 54, 905-12.
- MA, A. & MALYNN, B. A. 2012. A20: linking a complex regulator of ubiquitylation to immunity and human disease. *Nat Rev Immunol*, 12, 774-85.
- MAELFAIT, J. & BEYAERT, R. 2012. Emerging role of ubiquitination in antiviral RIG-I signaling. *Microbiol Mol Biol Rev*, 76, 33-45.
- MALEKSHAHI, S. S., SALIMI, V., AREFIAN, E., FATEMI-NASAB, G., ADJAMINEJAD-FARD, S., YAVARIAN, J. & MOKHTARI-AZAD, T. 2016. Inhibition of Respiratory Syncytial Virus Replication by Simultaneous Targeting of mRNA and Genomic RNA Using Dual-Targeting siRNAs. *Mol Biotechnol*, 58, 767-775.
- MANZONI, P., FIGUERAS-ALOY, J., SIMÕES, E. A. F., CHECCHIA, P. A., FAUROUX, B., BONT, L., PAES, B. & CARBONELL-ESTRANY, X. 2017. Defining the Incidence and Associated Morbidity and Mortality of Severe Respiratory Syncytial Virus Infection Among Children with Chronic Diseases. *Infect Dis Ther*, 6, 383-411.
- MARTIN-VICENTE, M., MEDRANO, L. M., RESINO, S., GARCIA-SASTRE, A. & MARTINEZ, I. 2017. TRIM25 in the Regulation of the Antiviral Innate Immunity. *Front Immunol*, 8, 1187.
- MARTÍN-VICENTE, M., RESINO, S. & MARTÍNEZ, I. 2019. siRNA-Mediated Simultaneous Regulation of the Cellular Innate Immune Response and Human Respiratory Syncytial Virus Replication. *Biomolecules*, 9.
- MARTÍNEZ, I., DOPAZO, J. & MELERO, J. A. 1997. Antigenic structure of the human respiratory syncytial virus G glycoprotein and relevance of hypermutation events for the generation of antigenic variants. *J Gen Virol*, 78 (Pt 10), 2419-29.
- MARTÍNEZ, I., LOMBARDÍA, L., GARCÍA-BARRENO, B., DOMÍNGUEZ, O. & MELERO, J. A. 2007. Distinct gene subsets are induced at different time points after human respiratory syncytial virus infection of A549 cells. *J Gen Virol*, 88, 570-81.
- MAZUR, N. I., HIGGINS, D., NUNES, M. C., MELERO, J. A., LANGEDIJK, A. C., HORSLEY, N., BUCHHOLZ, U. J., OPENSHAW, P. J., MCLELLAN, J. S., ENGLUND, J. A., MEJIAS, A., KARRON, R. A., SIMÕES, E. A., KNEZEVIC, I., RAMILO, O., PIEDRA, P. A., CHU, H. Y., FALSEY, A. R., NAIR, H., KRAGTEN-TABATABAIE, L., GREENOUGH, A., BARALDI, E., PAPADOPOULOS, N. G., VEKEMANS, J., POLACK, F. P., POWELL, M., SATAV, A., WALSH, E. E., STEIN, R. T., GRAHAM, B. S., BONT, L. J. & FOUNDATION, R. S. V. N. R. 2018. The respiratory syncytial virus vaccine landscape: lessons from the graveyard and promising candidates. *Lancet Infect Dis*, 18, e295-e311.
- MCCUTCHEON, K. M., JORDAN, R., MAWHORTER, M. E., NOTON, S. L., POWERS, J. G., FEARNES, R., CIHLAR, T. & PERRON, M. 2016. The Interferon Type I/III Response to Respiratory Syncytial Virus Infection in Airway Epithelial Cells Can Be Attenuated or Amplified by Antiviral Treatment. *J Virol*, 90, 1705-17.
- MCDOWELL, G. S. & PHILPOTT, A. 2013. Non-canonical ubiquitylation: mechanisms and consequences. *Int J Biochem Cell Biol*, 45, 1833-42.
- MCLELLAN, J. S., RAY, W. C. & PEEPLES, M. E. 2013. Structure and function of respiratory syncytial virus surface glycoproteins. *Curr Top Microbiol Immunol*, 372, 83-104.
- MEISSNER, H. C. 2003. Selected populations at increased risk from respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Infect Dis J*, 22, S40-4; discussion S44-5.
- MELERO, J. T., A. MAS, V. 2017. Respiratory syncytial virus. *Wiley online library*, 1-16.
- MILLER, E. K., WILLIAMS, J. V., GEBRETSADIK, T., CARROLL, K. N., DUPONT, W. D., MOHAMED, Y. A., MORIN, L. L., HEIL, L., MINTON, P. A., WOODWARD, K., LIU, Z. & HARTERT, T. V. 2011. Host and viral factors associated with severity of human rhinovirus-associated infant respiratory tract illness. *J Allergy Clin Immunol*, 127, 883-91.

- MONEY, V. A., MCPHEE, H. K., MOSELY, J. A., SANDERSON, J. M. & YEO, R. P. 2009. Surface features of a Mononegavirales matrix protein indicate sites of membrane interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 4441-6.
- MONICK, M. M., CAMERON, K., STABER, J., POWERS, L. S., YAROVINSKY, T. O., KOLAND, J. G. & HUNNINGHAKE, G. W. 2005. Activation of the epidermal growth factor receptor by respiratory syncytial virus results in increased inflammation and delayed apoptosis. *J Biol Chem*, 280, 2147-58.
- MUNIR, S., LE NOUEN, C., LUONGO, C., BUCHHOLZ, U. J., COLLINS, P. L. & BUKREYEV, A. 2008. Nonstructural proteins 1 and 2 of respiratory syncytial virus suppress maturation of human dendritic cells. *J Virol*, 82, 8780-96.
- MUNIYANDI, S., PANGRATIOU, G., EDWARDS, T. A. & BARR, J. N. 2018. Structure and Function of the Human Respiratory Syncytial Virus M2-1 Protein. *Subcell Biochem*, 88, 245-260.
- NASCIMENTO, M. S., SOUZA, A. V., FERREIRA, A. V., RODRIGUES, J. C., ABRAMOVICI, S. & SILVA FILHO, L. V. 2010. High rate of viral identification and coinfections in infants with acute bronchiolitis. *Clinics (Sao Paulo)*, 65, 1133-7.
- NEWTON, A. H., CARDANI, A. & BRACIALE, T. J. 2016. The host immune response in respiratory virus infection: balancing virus clearance and immunopathology. *Semin Immunopathol*, 38, 471-82.
- NGUYEN, N. T., NOW, H., KIM, W. J., KIM, N. & YOO, J. Y. 2016. Ubiquitin-like modifier FAT10 attenuates RIG-I mediated antiviral signaling by segregating activated RIG-I from its signaling platform. *Sci Rep*, 6, 23377.
- NOTON, S. L., COWTON, V. M., ZACK, C. R., MCGIVERN, D. R. & FEARNES, R. 2010. Evidence that the polymerase of respiratory syncytial virus initiates RNA replication in a nontemplated fashion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 10226-31.
- NOTON, S. L., DEFLUBE, L. R., TREMAGLIO, C. Z. & FEARNES, R. 2012. The respiratory syncytial virus polymerase has multiple RNA synthesis activities at the promoter. *PLoS Pathog*, 8, e1002980.
- NOTON, S. L. & FEARNES, R. 2011. The first two nucleotides of the respiratory syncytial virus antigenome RNA replication product can be selected independently of the promoter terminus. *RNA*, 17, 1895-906.
- O'DONNELL, D. R., MILLIGAN, L. & STARK, J. M. 1999. Induction of CD95 (Fas) and apoptosis in respiratory epithelial cell cultures following respiratory syncytial virus infection. *Virology*, 257, 198-207.
- OCHOA SANGRADOR, C., GONZÁLEZ DE DIOS, J. & ABREVIADO, G. D. R. D. P. 2010. [Consensus conference on acute bronchiolitis (VI): prognosis of acute bronchiolitis. Review of scientific evidence]. *An Pediatr (Barc)*, 72, 354.e1-354.e34.
- OGANESYAN, G., SAHA, S. K., GUO, B., HE, J. Q., SHAHANGIAN, A., ZARNEGAR, B., PERRY, A. & CHENG, G. 2006. Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature*, 439, 208-11.
- OKAMOTO, M., KOUWAKI, T., FUKUSHIMA, Y. & OSHIUMI, H. 2017. Regulation of RIG-I Activation by K63-Linked Polyubiquitination. *Front Immunol*, 8, 1942.
- OLSZEWSKA, W., ISPAS, G., SCHNOELLER, C., SAWANT, D., VAN DE CASTEELE, T., NAUWELAERS, D., VAN KERCKHOVE, B., ROYMANS, D., DE MEULDER, M., ROUAN, M. C., VAN REMOORTERE, P., BONFANTI, J. F., VAN VELSEN, F., KOUL, A., VANSTOCKEM, M., ANDRIES, K., SOWINSKI, P., WANG, B., OPENSHAW, P. & VERLOES, R. 2011. Antiviral and lung protective activity of a novel respiratory syncytial virus fusion inhibitor in a mouse model. *Eur Respir J*, 38, 401-8.
- OPENSHAW, P. J. & TREGONING, J. S. 2005. Immune responses and disease enhancement during respiratory syncytial virus infection. *Clin Microbiol Rev*, 18, 541-55.
- OPENSHAW, P. J. M., CHIU, C., CULLEY, F. J. & JOHANSSON, C. 2017. Protective and Harmful Immunity to RSV Infection. *Annu Rev Immunol*, 35, 501-532.

- OSHANSKY, C. M., ZHANG, W., MOORE, E. & TRIPP, R. A. 2009. The host response and molecular pathogenesis associated with respiratory syncytial virus infection. *Future Microbiol*, 4, 279-97.
- OSHIMA, S., TURER, E. E., CALLAHAN, J. A., CHAI, S., ADVINCULA, R., BARRERA, J., SHIFRIN, N., LEE, B., BENEDICT YEN, T. S., YEN, B., WOO, T., MALYNN, B. A. & MA, A. 2009. ABIN-1 is a ubiquitin sensor that restricts cell death and sustains embryonic development. *Nature*, 457, 906-9.
- OSHIUMI, H., MATSUMOTO, M., HATAKEYAMA, S. & SEYA, T. 2009. Riplet/RNF135, a RING finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon-beta induction during the early phase of viral infection. *J Biol Chem*, 284, 807-17.
- OSHIUMI, H., MATSUMOTO, M. & SEYA, T. 2012. Ubiquitin-mediated modulation of the cytoplasmic viral RNA sensor RIG-I. *J Biochem*, 151, 5-11.
- PARAMORE, L. C., CIURYLA, V., CIESLA, G. & LIU, L. 2004. Economic impact of respiratory syncytial virus-related illness in the US: an analysis of national databases. *Pharmacoeconomics*, 22, 275-84.
- PATH. 2019. *RSV vaccines and mAb Snapshot* [Online]. PATH. Available: <https://www.path.org/resources/rsv-vaccine-and-mab-snapshot/>.
- PICKLES, R. J. & DEVINCENZO, J. P. 2015. Respiratory syncytial virus (RSV) and its propensity for causing bronchiolitis. *J Pathol*, 235, 266-76.
- PIEDIMONTE, G. & PEREZ, M. K. 2014. Respiratory syncytial virus infection and bronchiolitis. *Pediatr Rev*, 35, 519-30.
- PIEDRA, F. A., MEI, M., AVADHANULA, V., MEHTA, R., AIDEYAN, L., GAROFALO, R. P. & PIEDRA, P. A. 2017. The interdependencies of viral load, the innate immune response, and clinical outcome in children presenting to the emergency department with respiratory syncytial virus-associated bronchiolitis. *PLoS One*, 12, e0172953.
- PIEDRA, P. A., JEWELL, A. M., CRON, S. G., ATMAR, R. L. & GLEZEN, W. P. 2003. Correlates of immunity to respiratory syncytial virus (RSV) associated-hospitalization: establishment of minimum protective threshold levels of serum neutralizing antibodies. *Vaccine*, 21, 3479-82.
- POTACZEK, D. P., GARN, H., UNGER, S. D. & RENZ, H. 2016. Antisense molecules: A new class of drugs. *J Allergy Clin Immunol*, 137, 1334-46.
- PRINCIPI, N. & ESPOSITO, S. 2009. Antigen-based assays for the identification of influenza virus and respiratory syncytial virus: why and how to use them in pediatric practice. *Clin Lab Med*, 29, 649-60.
- QURESHI, A., TANTRAY, V. G., KIRMANI, A. R. & AHANGAR, A. G. 2018. A review on current status of antiviral siRNA. *Rev Med Virol*, 28, e1976.
- RAMILO & OSJ, W. K., JENSEN K, HARRIS B, LOSONSKY G, GRIFFIN P 2012. Motavizumab treatment of children hospitalized with RSV lower respiratory tract infection does not decrease viral load or severity of illness. RSV Symposium.
- RANMUTHUGALA, G., BROWN, L. & LIDBURY, B. A. 2011. Respiratory syncytial virus--the unrecognised cause of health and economic burden among young children in Australia. *Commun Dis Intell Q Rep*, 35, 177-84.
- REN, J., LIU, T., PANG, L., LI, K., GAROFALO, R. P., CASOLA, A. & BAO, X. 2011. A novel mechanism for the inhibition of interferon regulatory factor-3-dependent gene expression by human respiratory syncytial virus NS1 protein. *J Gen Virol*, 92, 2153-9.
- RICHARD, C. A., RINCHEVAL, V., LASSOUED, S., FIX, J., CARDONE, C., ESNEAU, C., NEKHAI, S., GALLOUX, M., RAMEIX-WELTI, M. A., SIZUN, C. & ELÉOUËT, J. F. 2018. RSV hijacks cellular protein phosphatase 1 to regulate M2-1 phosphorylation and viral transcription. *PLoS Pathog*, 14, e1006920.
- ROBERTS, A., PIMENTEL, H., TRAPNELL, C. & PACTER, L. 2011. Identification of novel transcripts in annotated genomes using RNA-Seq. *Bioinformatics*, 27, 2325-9.

- ROMAN, M., CALHOUN, W. J., HINTON, K. L., AVENDANO, L. F., SIMON, V., ESCOBAR, A. M., GAGGERO, A. & DIAZ, P. V. 1997. Respiratory syncytial virus infection in infants is associated with predominant Th-2-like response. *Am J Respir Crit Care Med*, 156, 190-5.
- RUDD, B. D., BURSTEIN, E., DUCKETT, C. S., LI, X. & LUKACS, N. W. 2005. Differential role for TLR3 in respiratory syncytial virus-induced chemokine expression. *J Virol*, 79, 3350-7.
- RUSSELL, C. D., UNGER, S. A., WALTON, M. & SCHWARZE, J. 2017. The Human Immune Response to Respiratory Syncytial Virus Infection. *Clin Microbiol Rev*, 30, 481-502.
- SAITOH, T., YAMAMOTO, M., MIYAGISHI, M., TAIRA, K., NAKANISHI, M., FUJITA, T., AKIRA, S., YAMAMOTO, N. & YAMAOKA, S. 2005. A20 is a negative regulator of IFN regulatory factor 3 signaling. *J Immunol*, 174, 1507-12.
- SCHMIDT, M. E. & VARGA, S. M. 2017. Modulation of the host immune response by respiratory syncytial virus proteins. *J Microbiol*, 55, 161-171.
- SEMPLE, M. G., TAYLOR-ROBINSON, D. C., LANE, S. & SMYTH, R. L. 2011. Household tobacco smoke and admission weight predict severe bronchiolitis in infants independent of deprivation: prospective cohort study. *PLoS One*, 6, e22425.
- SHAO, L., OSHIMA, S., DUONG, B., ADVINCULA, R., BARRERA, J., MALYNN, B. A. & MA, A. 2013. A20 restricts wnt signaling in intestinal epithelial cells and suppresses colon carcinogenesis. *PLoS One*, 8, e62223.
- SHEMBADE, N. & HARHAJ, E. W. 2012. Regulation of NF- κ B signaling by the A20 deubiquitinase. *Cell Mol Immunol*, 9, 123-30.
- SHEMBADE, N., HARHAJ, N. S., LIEBL, D. J. & HARHAJ, E. W. 2007. Essential role for TAX1BP1 in the termination of TNF- α -, IL-1- and LPS-mediated NF- κ B and JNK signaling. *EMBO J*, 26, 3910-22.
- SHEMBADE, N., HARHAJ, N. S., PARVATIYAR, K., COPELAND, N. G., JENKINS, N. A., MATESIC, L. E. & HARHAJ, E. W. 2008. The E3 ligase Itch negatively regulates inflammatory signaling pathways by controlling the function of the ubiquitin-editing enzyme A20. *Nat Immunol*, 9, 254-62.
- SHEMBADE, N., PARVATIYAR, K., HARHAJ, N. S. & HARHAJ, E. W. 2009. The ubiquitin-editing enzyme A20 requires RNF11 to downregulate NF- κ B signalling. *EMBO J*, 28, 513-22.
- SHI, C. S. & KEHRL, J. H. 2010. TRAF6 and A20 regulate lysine 63-linked ubiquitination of Beclin-1 to control TLR4-induced autophagy. *Sci Signal*, 3, ra42.
- SHI, T., MCALLISTER, D. A., O'BRIEN, K. L., SIMOES, E. A. F., MADHI, S. A., GESSNER, B. D., POLACK, F. P., BALSELLS, E., ACACIO, S., AGUAYO, C., ALASSANI, I., ALI, A., ANTONIO, M., AWASTHI, S., AWORI, J. O., AZZIZ-BAUMGARTNER, E., BAGGETT, H. C., BAILLIE, V. L., BALMASEDA, A., BARAHONA, A., BASNET, S., BASSAT, Q., BASUALDO, W., BIGOGO, G., BONT, L., BREIMAN, R. F., BROOKS, W. A., BROOR, S., BRUCE, N., BRUDEN, D., BUCHY, P., CAMPBELL, S., CAROSONE-LINK, P., CHADHA, M., CHIPETA, J., CHOU, M., CLARA, W., COHEN, C., DE CUELLAR, E., DANG, D. A., DASH-YANDAG, B., DELORIA-KNOLL, M., DHERANI, M., EAP, T., EBRUKE, B. E., ECHAVARRIA, M., DE FREITAS LÁZARO EMEDIATO, C. C., FASCE, R. A., FEIKIN, D. R., FENG, L., GENTILE, A., GORDON, A., GOSWAMI, D., GOYET, S., GROOME, M., HALASA, N., HIRVE, S., HOMAIRA, N., HOWIE, S. R. C., JARA, J., JROUNDI, I., KARTASASMITA, C. B., KHURI-BULOS, N., KOTLOFF, K. L., KRISHNAN, A., LIBSTER, R., LOPEZ, O., LUCERO, M. G., LUCION, F., LUPISAN, S. P., MARCONE, D. N., MCCracken, J. P., MEJIA, M., MOISI, J. C., MONTGOMERY, J. M., MOORE, D. P., MORALEDA, C., MOYES, J., MUNYWOKI, P., MUTYARA, K., NICOL, M. P., NOKES, D. J., NYMADAWA, P., DA COSTA OLIVEIRA, M. T., OSHITANI, H., PANDEY, N., PARANHOS-BACCALÀ, G., PHILLIPS, L. N., PICOT, V. S., RAHMAN, M., RAKOTO-ANDRIANARIVELO, M., RASMUSSEN, Z. A., RATH, B. A., ROBINSON, A., ROMERO, C., RUSSOMANDO, G., SALIMI, V., SAWATWONG, P., SCHELTEMA, N., SCHWEIGER, B., et al. 2017. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. *Lancet*, 390, 946-958.

- SKAUG, B., CHEN, J., DU, F., HE, J., MA, A. & CHEN, Z. J. 2011. Direct, noncatalytic mechanism of IKK inhibition by A20. *Mol Cell*, 44, 559-71.
- SONG, X., YAO, Z., YANG, J., ZHANG, Z., DENG, Y., LI, M., MA, C., YANG, L., GAO, X., LI, W., LIU, J. & WEI, L. 2016. HCV core protein binds to gC1qR to induce A20 expression and inhibit cytokine production through MAPKs and NF-kappaB signaling pathways. *Oncotarget*, 7, 33796-808.
- SPANN, K. M., TRAN, K. C. & COLLINS, P. L. 2005. Effects of nonstructural proteins NS1 and NS2 of human respiratory syncytial virus on interferon regulatory factor 3, NF-kappaB, and proinflammatory cytokines. *J Virol*, 79, 5353-62.
- SPANN, K. M., TRAN, K. C., CHI, B., RABIN, R. L. & COLLINS, P. L. 2004. Suppression of the induction of alpha, beta, and lambda interferons by the NS1 and NS2 proteins of human respiratory syncytial virus in human epithelial cells and macrophages [corrected]. *J Virol*, 78, 4363-9.
- STEGMEIER, F., SOWA, M. E., NALEPA, G., GYGI, S. P., HARPER, J. W. & ELLEDGE, S. J. 2007. The tumor suppressor CYLD regulates entry into mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 8869-74.
- SUN, S. C. & LEY, S. C. 2008. New insights into NF-kappaB regulation and function. *Trends Immunol*, 29, 469-78.
- SUN, Y. & LOPEZ, C. B. 2017. The innate immune response to RSV: Advances in our understanding of critical viral and host factors. *Vaccine*, 35, 481-488.
- SUNDARAM, M. E., MEECE, J. K., SIFAKIS, F., GASSER, R. A. & BELONGIA, E. A. 2014. Medically attended respiratory syncytial virus infections in adults aged ≥ 50 years: clinical characteristics and outcomes. *Clin Infect Dis*, 58, 342-9.
- TAKEUCHI, O. & AKIRA, S. 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140, 805-20.
- TAN, L., COENJAERTS, F. E., HOUSPIE, L., VIVEEN, M. C., VAN BLEEK, G. M., WIERTZ, E. J., MARTIN, D. P. & LEMEY, P. 2013. The comparative genomics of human respiratory syncytial virus subgroups A and B: genetic variability and molecular evolutionary dynamics. *J Virol*, 87, 8213-26.
- TIONG-YIP, CLFM, L. A., J, F., KD, J., D, B., H, X. & Q, Y. 2012. Characterization of a novel RSV L polymerase inhibitor. RSV symposium, Santa Fe, NM.
- TRAPNELL, C., ROBERTS, A., GOFF, L., PERTEA, G., KIM, D., KELLEY, D. R., PIMENTEL, H., SALZBERG, S. L., RINN, J. L. & PACHTER, L. 2012. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc*, 7, 562-78.
- TRIPP, R. A. 2004. Pathogenesis of respiratory syncytial virus infection. *Viral Immunol*, 17, 165-81.
- VARGA, S. M. & BRACIALE, T. J. 2013. The adaptive immune response to respiratory syncytial virus. *Curr Top Microbiol Immunol*, 372, 155-71.
- VERHELST, K., CARPENTIER, I., KREIKE, M., MELONI, L., VERSTREPEN, L., KENSCH, T., DIKIC, I. & BEYAERT, R. 2012. A20 inhibits LUBAC-mediated NF- κ B activation by binding linear polyubiquitin chains via its zinc finger 7. *EMBO J*, 31, 3845-55.
- VERSTREPEN, L., VERHELST, K., CARPENTIER, I. & BEYAERT, R. 2011. TAX1BP1, a ubiquitin-binding adaptor protein in innate immunity and beyond. *Trends Biochem Sci*, 36, 347-54.
- VIG, K., LEWIS, N., MOORE, E. G., PILLAI, S., DENNIS, V. A. & SINGH, S. R. 2009. Secondary RNA structure and its role in RNA interference to silence the respiratory syncytial virus fusion protein gene. *Mol Biotechnol*, 43, 200-11.
- VINCENT, J. O., LO, H. Y. & WU, S. 2017. Bronchiolitis Care in the Hospital. *Rev Recent Clin Trials*, 12, 246-252.
- WAGNER, S., CARPENTIER, I., ROGOV, V., KREIKE, M., IKEDA, F., LOHR, F., WU, C. J., ASHWELL, J. D., DOTTSCH, V., DIKIC, I. & BEYAERT, R. 2008. Ubiquitin binding mediates the NF-kappaB inhibitory potential of ABIN proteins. *Oncogene*, 27, 3739-45.
- WALSH, E. E. 2017. Respiratory Syncytial Virus Infection: An Illness for All Ages. *Clin Chest Med*, 38, 29-36.
- WANG, J. T., MCELVAIN, L. E. & WHELAN, S. P. 2007. Vesicular stomatitis virus mRNA capping machinery requires specific cis-acting signals in the RNA. *J Virol*, 81, 11499-506.

- WANG, L., WANG, S. & LI, W. 2012. RSeQC: quality control of RNA-seq experiments. *Bioinformatics*, 28, 2184-5.
- WANG, W., JIANG, M., LIU, S., ZHANG, S., LIU, W., MA, Y., ZHANG, L., ZHANG, J. & CAO, X. 2016. RNF122 suppresses antiviral type I interferon production by targeting RIG-I CARDs to mediate RIG-I degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, 9581-6.
- WELLIVER, R. C., SR. 2008. The immune response to respiratory syncytial virus infection: friend or foe? *Clin Rev Allergy Immunol*, 34, 163-73.
- WIDMER, K., GRIFFIN, M. R., ZHU, Y., WILLIAMS, J. V. & TALBOT, H. K. 2014. Respiratory syncytial virus- and human metapneumovirus-associated emergency department and hospital burden in adults. *Influenza Other Respir Viruses*, 8, 347-52.
- XU, X. X., WAN, H., NIE, L., SHAO, T., XIANG, L. X. & SHAO, J. Z. 2018. RIG-I: a multifunctional protein beyond a pattern recognition receptor. *Protein Cell*, 9, 246-253.
- YAMAGUCHI, N., OYAMA, M., KOZUKA-HATA, H. & INOUE, J. 2013. Involvement of A20 in the molecular switch that activates the non-canonical NF- κ B pathway. *Sci Rep*, 3, 2568.
- ZAMORA, M. R., BUDEV, M., ROLFE, M., GOTTLIEB, J., HUMAR, A., DEVINCENZO, J., VAISHNAW, A., CEHELSKY, J., ALBERT, G., NOCHUR, S., GOLLOB, J. A. & GLANVILLE, A. R. 2011. RNA interference therapy in lung transplant patients infected with respiratory syncytial virus. *Am J Respir Crit Care Med*, 183, 531-8.
- ZENG, W., XU, M., LIU, S., SUN, L. & CHEN, Z. J. 2009. Key role of Ubc5 and lysine-63 polyubiquitination in viral activation of IRF3. *Mol Cell*, 36, 315-25.
- ZETOUNE, F. S., MURTHY, A. R., SHAO, Z., HLAING, T., ZEIDLER, M. G., LI, Y. & VINCENZ, C. 2001. A20 inhibits NF-kappa B activation downstream of multiple Map3 kinases and interacts with the I kappa B signalosome. *Cytokine*, 15, 282-98.
- ZHANG, L., PEEPLES, M. E., BOUCHER, R. C., COLLINS, P. L. & PICKLES, R. J. 2002. Respiratory syncytial virus infection of human airway epithelial cells is polarized, specific to ciliated cells, and without obvious cytopathology. *J Virol*, 76, 5654-66.
- ZHANG, W., YANG, H., KONG, X., MOHAPATRA, S., SAN JUAN-VERGARA, H., HELLERMANN, G., BEHERA, S., SINGAM, R., LOCKEY, R. F. & MOHAPATRA, S. S. 2005. Inhibition of respiratory syncytial virus infection with intranasal siRNA nanoparticles targeting the viral NS1 gene. *Nat Med*, 11, 56-62.
- ZINNGREBE, J., MONTINARO, A., PELTZER, N. & WALCZAK, H. 2014. Ubiquitin in the immune system. *EMBO Rep*, 15, 28-45.

ANEXO I

ANEXO I

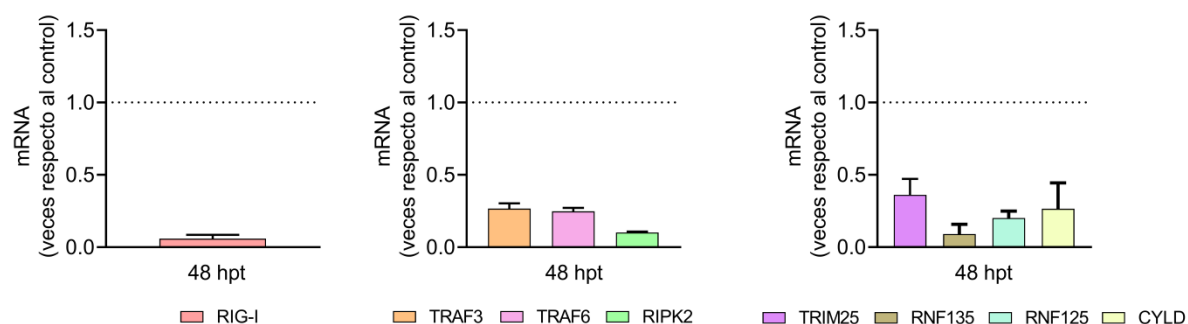


Figura 1: Silenciamiento de diversos genes relacionados con la señalización inducida por RIG-I. Niveles de expresión de diferentes genes silenciados por medio de siRNAs específicos para cada caso, a 48 horas post-transfección, en comparación con los datos obtenidos en células transfectadas con un siRNA control. De izquierda a derecha: Silenciamiento de la expresión de RIG-I, silenciamiento de la expresión de los adaptadores de la ruta de señalización TRAF3, TRAF6 y RIPK2, silenciamiento de varias de las proteínas reguladoras de la actividad de RIG-I (TRIM25, RNF35 (RIPLET), RNF125 y CYLD). Los datos muestran la media y desviación estándar de al menos tres ensayos independientes.

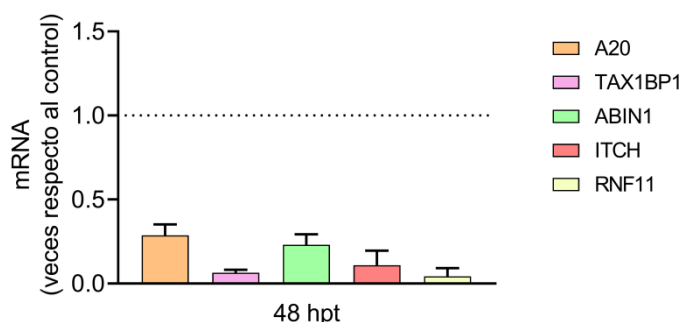


Figura 2: Silenciamiento de la expresión de A20 y de las proteínas que interaccionan con ella. Niveles de expresión de A20, TAX1BP1, ABIN1, ITCH y RNF11 en células silenciadas con los correspondientes siRNAs a 48 horas post-transfección, con respecto a los datos obtenidos de células transfectadas con un siRNA control. Los datos muestran la media y desviación estándar de al menos 3 ensayos independientes.

	Media (SD)
A20	423.10 (276.70)
TAX1BP1	58.28 (28.69)

	Media (SD)
A20	250.90 (50.95)
TAX1BP1	16.73 (2.037)
ABIN1	318.50 (41.70)

Figura 3: Niveles de expresión de A20, TAX1BP1 o ABIN1 en células transfectadas con los plásmidos correspondientes. La tabla de la izquierda muestra los datos obtenidos en las transfecciones simples con un plásmido específico para A20 o para TAX1BP1. La tabla de la derecha muestra los datos obtenidos de la transfección con la mezcla de los tres plásmidos indicados (A20, TAX1BP1 y ABIN1). En las tablas se muestran la media y desviación estándar de al menos tres ensayos independientes.

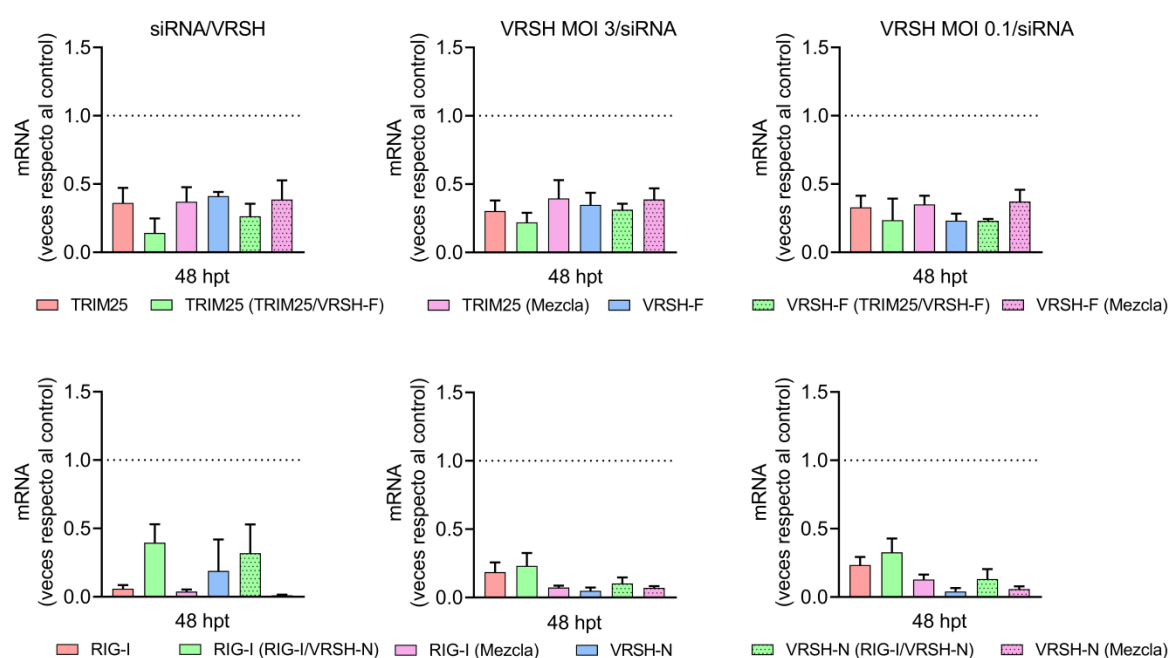


Figura 4: Silenciamiento de la expresión de los genes celulares y virales diana de los siRNAs biespecíficos. En la parte superior se muestran los niveles de expresión de TRIM25 y la proteína F del VRSH, y en la parte inferior los niveles de expresión correspondientes a RIG-I y la nucleoproteína (N) del virus en células silenciadas con los siRNAs indicados entre paréntesis. Los niveles de mRNA fueron cuantificados por qPCR a 48 horas post-transfección, con respecto a los valores obtenidos en células transfectadas con un siRNA control. Los datos muestran la media y desviación estándar de al menos tres ensayos independientes.

ANEXO II

ANEXO II

AII.1. PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS

Martín-Vicente M, Medrano ML, Resino S, García-Sastre A and Martínez I. 2017. TRIM25 in the regulation of the antiviral innate immunity. *Front Immunol.* 8:1187

Martín-Vicente M, Resino S and Martínez I. 2019. siRNA-Mediated simultaneous regulation of the cellular innate immune response and human respiratory syncytial virus replication. *Biomolecules* 9(5).

Jiménez-Sousa MA, Berenguer J, Fernández-Rodríguez A, Medrano LM, Aldámiz-Echevarría T, Pérez-Latorre L, DíezC, Martín-Vicente M, Gutierrez-Rivas M, Martínez I and Resino S. 2019. Genetic variants upstream of TNFAIP3 in the 6q23 region are associated with liver disease severity in HIV/HCV-coinfected patients: A cross-sectional study. *Infect Genet Evol.* 67:112-120

Martín-Vicente M, González-Sanz R, Cuesta I, Monzón S, Resino S and Martínez I. 2020. Downregulation of A20 expression increases the immune response and apoptosis and reduces virus production in cell infected by the human respiratory syncytial virus. **Aceptado.**

AII.2. OTRAS PUBLICACIONES

Magro-López E, Guijarro T, Martínez I, Martín-Vicente M, Liste I and Zambrano A. 2017. A two-dimensional human minilung system (model) for respiratory syncytial virus infections. *Viruses.* 9(12).

Jiménez-Sousa MA, Gómez-Moreno AZ, Pineda-Tenor D, Sánchez-Ruano JJ, Fernández-Rodríguez A, Artaza-Varasa T, Gómez-Sanz A, Martín-Vicente M, Vázquez-Morón S and Resino S. 2018. PNPLA3 rs738409 polymorphism is associated with liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C: A repeated measures study. *J Clin Virol.* 103:71-74.

Jiménez-Sousa MA, Gómez-Moreno AZ, Pineda-Tenor D, Sánchez-Ruano JJ, Artasa-Varasa T, Martín-Vicente M, Fernández-Rodríguez A, Martínez I and Resino S. 2019. Impact of *DARC* rs12075 variants in liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C: A retrospective Study. *Biomolecules*. 9(4).

Martín-Vicente M, González-Riaño C, Barbas C, Jiménez-Sousa MA, Brochado-Kith O, Resino S and Martínez I. Metabolic changes throughout respiratory syncytial virus infection of epithelial cells. **En revisión.**



TRIM25 in the Regulation of the Antiviral Innate Immunity

María Martín-Vicente¹, Luz M. Medrano¹, Salvador Resino¹, Adolfo García-Sastre^{2,3,4} and Isidoro Martínez^{1*}

¹ Unidad de Infección Viral e Inmunidad, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain,

² Department of Microbiology, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY, United States, ³ Global Health and Emerging Pathogens Institute, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY, United States, ⁴ Department of Medicine, Division of Infectious Diseases, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY, United States

TRIM25 is an E3 ubiquitin ligase enzyme that is involved in various cellular processes, including regulation of the innate immune response against viruses. TRIM25-mediated ubiquitination of the cytosolic pattern recognition receptor RIG-I is an essential step for initiation of the intracellular antiviral response and has been thoroughly documented. In recent years, however, additional roles of TRIM25 in early innate immunity are emerging, including negative regulation of RIG-I, activation of the melanoma differentiation-associated protein 5–mitochondrial antiviral signaling protein–TRAF6 antiviral axis and modulation of p53 levels and activity. In addition, the ability of TRIM25 to bind RNA may uncover new mechanisms by which this molecule regulates intracellular signaling and/or RNA virus replication.

Keywords: TRIM25, innate immunity, ubiquitination, virus, E3 ubiquitin ligase

INTRODUCTION

The innate immune response is the first line of defense against invading pathogens. At the cellular level, this response is stimulated by several cellular “pattern recognition receptors” (PRRs) that recognize microbial-specific molecules termed “pathogen-associated molecular patterns” (PAMPs). Bacterial PAMPs include lipopolysaccharide (LPS), flagellin, peptidoglycan, and cyclic dinucleotides, among others. Although viral proteins are able to stimulate specific PRRs, the main viral PAMPs are nucleic acids, including double-stranded RNA (dsRNA), uncapped single-stranded RNA, and viral DNA (1–3). Two main groups of PRRs that recognize virus-derived nucleic acids have been described according to their location: (1) membrane-spanning toll-like receptors (TLRs), which detect viral RNA or DNA in endosomes and (2) cytoplasmic sensors, including RIG-I-like receptors (RLRs), NOD-like receptors (NLRs), which recognize cytoplasmic viral RNA, and a group of structurally unrelated intracellular viral DNA sensors (1) (**Figure 1**). Binding of PAMPs to PRRs leads to the activation of intracellular signaling pathways that produce type I interferons and inflammatory cytokines (4). These pathways converge at the level of several kinases of the inhibitor of nuclear factor kappa-B [IkB] kinase (IKK) family: the canonical complex composed of IKK α , IKK β and the regulatory subunit IKK γ /NEMO, and the non-canonical IKK ϵ and TANK-binding kinase-1 (TBK1) (**Figure 1**). The IKK α / β / γ complex activates nuclear factor kappa B (NF- κ B), while TBK1/IKK ϵ activates IFN-regulatory factors 3 and 7 (IRF3/7) (5, 6). In addition, PRRs trigger phosphorylation of several mitogen-activated protein kinases (MAPK), which leads to activation of activator protein-1 (AP-1). Upon translocation into the nucleus, the transcription factors NF- κ B, IRF3/7, and AP-1 induce the expression of IFNs and other cytokines and antiviral molecules (7)

OPEN ACCESS

Edited by:

Thomas A. Kufer,
University of Hohenheim, Germany

Reviewed by:

Ashley Mansell,
Hudson Institute of Medical
Research, Australia
Isabelle Vergne,
Centre National de la Recherche
Scientifique (CNRS), France

*Correspondence:

Isidoro Martínez
imago@isciii.es

Specialty section:

This article was submitted to
Molecular Innate Immunity,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 06 July 2017

Accepted: 07 September 2017

Published: 22 September 2017

Citation:

Martín-Vicente M, Medrano LM,
Resino S, García-Sastre A and
Martínez I (2017) TRIM25 in the
Regulation of the Antiviral Innate
Immunity.
Front. Immunol. 8:1187.
doi: 10.3389/fimmu.2017.01187

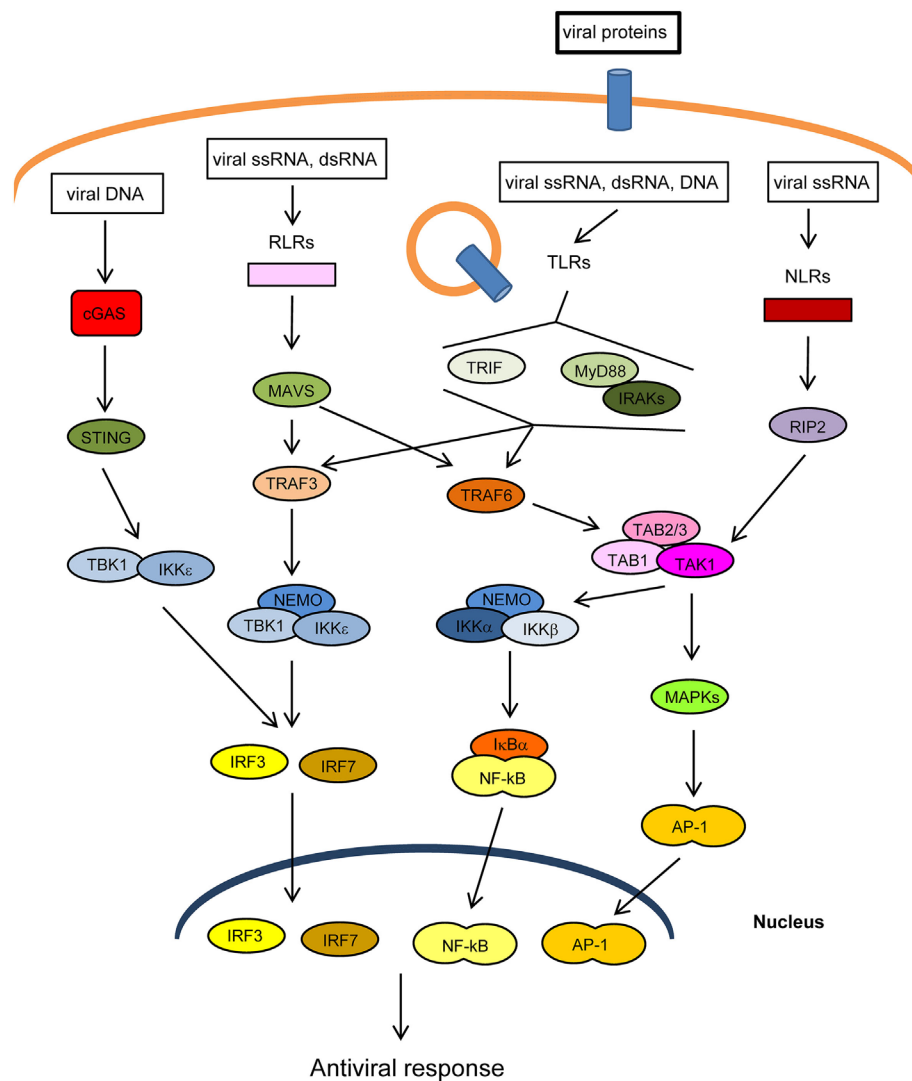


FIGURE 1 | Main pathways of antiviral innate immunity. After recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) by pattern recognition receptors (PRRs) [cGAS, RIG-I-like receptors (RLRs), toll-like receptors (TLRs), NOD-like receptors (NLRs)], the signal is propagated through adaptor proteins (STING, MAVS, MyD88, TRIF) to members of the TRAF ubiquitin E3 ligase family (TRAF3/6) and to kinase complexes (IKK α /β/γ, TBK1/IKK ϵ , TAK1/TAB 1/2/3, MAPKs), which trigger the activation of IRF3/7, NF-κB and AP-1 transcription factors and the expression of IFN-I, proinflammatory cytokines, and other antiviral genes. The activity or stability of most of these proteins is regulated by ubiquitination/deubiquitination processes.

(Figure 1). These molecules not only inhibit viral replication, assembly, and spread but also play a crucial role in activating the adaptive immune response (8).

The innate immune response is crucial for limiting viral infections, but it has to be tightly regulated to avoid immune-mediated tissue damage, excessive inflammation, and auto-immunity (9–11). In this regard, the complex interactions between molecules of intracellular signaling networks leading to the antiviral response are regulated by various mechanisms, of which post-translational protein modification is one of the most relevant. It has been known for a long time that phosphorylation plays a crucial role in the regulation of such networks but, in recent years, reversible conjugation to ubiquitin and ubiquitin-like proteins

has emerged as an additional and central mechanism regulating intracellular signaling (12–16).

UBIQUITINATION/DEUBIQUITINATION PROCESSES ADJUST THE INNATE IMMUNE RESPONSE

Ubiquitin is a 76 amino acid (8.5 kDa) protein that can be covalently ligated to lysine residues of a target protein through its conserved C-terminal di-glycine motif (17). Ubiquitination is a three-step enzymatic process involving three enzymes with distinct functions: E1 activating, E2 conjugating, and

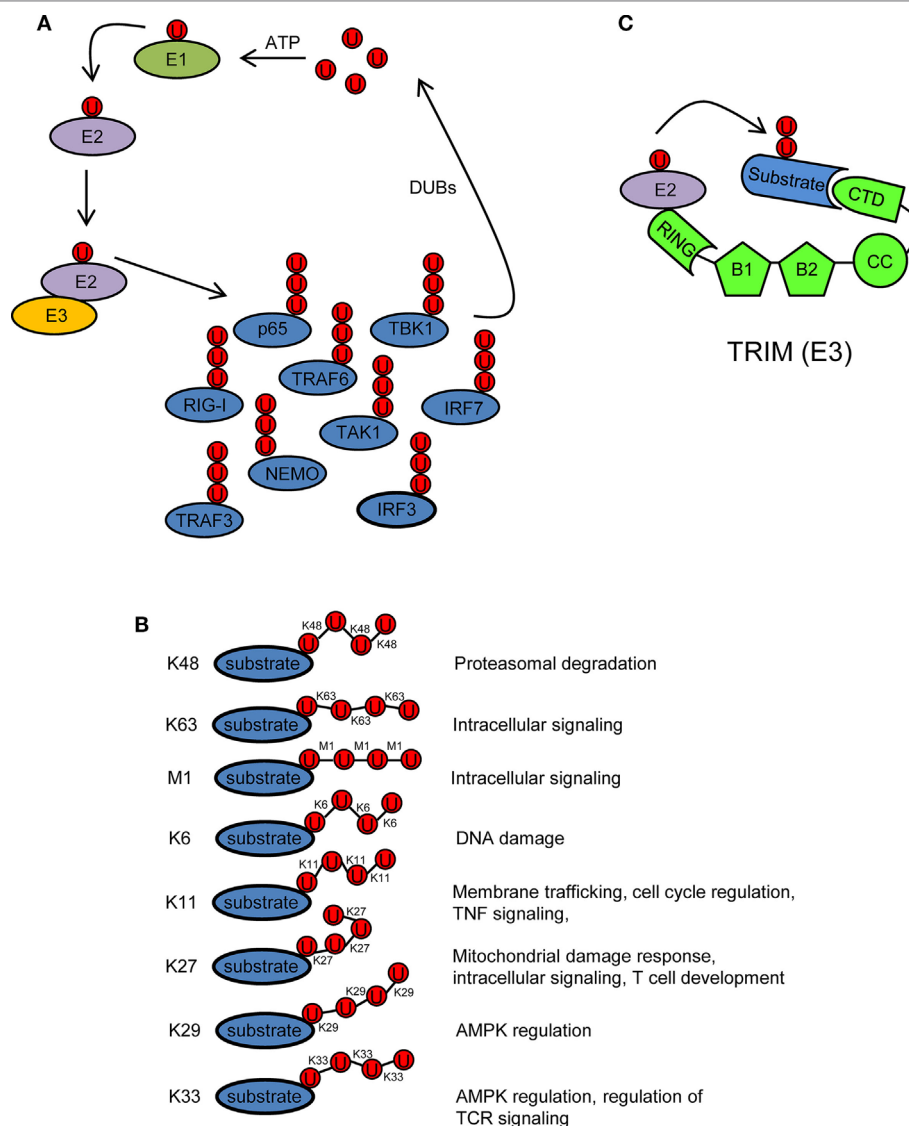


FIGURE 2 | Ubiquitination/deubiquitination regulates intracellular immune pathways. **(A)** Ubiquitination is a three-step enzymatic process by which ubiquitin is covalently attached to target proteins, including ubiquitin itself. This process is reversed by deubiquitinases (DUBs). The activity of several molecules (p65, RIG-I, TRAF3/6, NEMO, IRF3/7, etc.) participating in intracellular immune signaling pathways is regulated by ubiquitination/deubiquitination modifications. E1, ubiquitin activating enzyme; E2, ubiquitin conjugating enzyme; E3, ubiquitin ligase. **(B)** Ubiquitin linkage types and their functional roles. Different ubiquitin linkages led to different conformations of ubiquitin chains that are recognized by proteins containing ubiquitin-binding domains. **(C)** Schematic representation of a tripartite motif (TRIM) molecule, including the conserved N-terminal TRIM [really interesting new gene (RING), B box, and coiled-coil (CC) domains] and a C-terminal variable domain (CTD). Ubiquitin-loaded E2 and substrate are recognized by the RING and CTD domains of TRIM, respectively. This brings both molecules in close proximity and facilitates substrate ubiquitination. Ubiquitin molecules in **(A–C)** are represented by a U inside a red circle. The number of Us does not represent the actual level of ubiquitination.

E3 ligating (**Figure 2A**). The first step is the formation of a thioester linkage between ubiquitin and the E1. In the next step, ubiquitin is transferred from E1 to the active-site cysteine of E2. Finally, E3 assists the formation of an isopeptide bond between the C-terminal glycine of ubiquitin and a lysine residue of a target protein (18–21). Ubiquitin itself can be ubiquitinated and form polyubiquitin chains (polyubiquitination). Ubiquitin contains seven lysine residues (K6, K11, K27, K29, K33, K48, and K63) on which diverse chain types of polyubiquitin can be assembled (20) (**Figure 2B**). In addition, ubiquitin chains

can also be linked in a linear (M1) fashion by attachment of the C-terminal glycine of an ubiquitin to the N-terminal methionine of another ubiquitin, resulting in a head-to-tail polyubiquitination (22) (**Figure 2B**). Different ubiquitin linkages fulfill different functions (**Figure 2B**). K48- and K63-linked polyubiquitin chains are the best characterized. K48 linkage targets proteins for proteasomal degradation, whereas K63 and M1 linkages regulate intracellular immune signals (14–16, 23, 24). The other linkage types are referred as “atypical” and have not been studied in much detail (25). Each chain

type has a different three-dimensional conformation that is recognized specifically by ubiquitin-binding proteins (UBPs). This recognition is essential for the transmission of intracellular signaling (26–28). Recently, it has been reported that in addition to the above described covalently attached polyubiquitin chains, unanchored polyubiquitin chains also contribute to the activation of intracellular pathways leading to the onset of the antiviral response (29, 30).

Ubiquitination is reversed by deubiquitinases (DUBs) that detach ubiquitin from the substrate (**Figure 2A**). This usually leads to termination of immune signaling. In this way, ubiquitination/deubiquitination processes dynamically regulate the early innate immune response and prevent immune-mediated host damage (13).

TRIPARTITE MOTIF (TRIM) PROTEINS ARE E3 UBIQUITIN LIGASES

Tripartite motif proteins have E3 ubiquitin ligase activity and form a large family with over 70 members in humans. Their name is derived from the fact that they share three conserved N-terminal domains: a really interesting new gene (RING) domain, one or two B-Boxes (B1/B2) and a coiled-coil (CC) domain. By contrast, the C-terminal region is of variable composition (31, 32) (**Figure 2C**). The RING and B-box domains are both cysteine–histidine-rich domains that bind zinc atoms. The RING domain recognizes the ubiquitin-loaded E2 conjugating enzyme and promotes ubiquitin conjugation to target proteins (32–35) (**Figure 2C**). Based on conserved structural features with the RING domain, it has been suggested that the B-boxes could also contribute to E3 ubiquitin ligase activity of TRIM proteins (36, 37). In some TRIMs, B-box domains mediate self-association, which may be important for TRIM oligomerization (38–40). The CC domain is necessary for dimerization of TRIM ligases (41). Finally, the variable C-terminal domain may mediate interaction with specific substrates (**Figure 2C**). The most common C-terminal TRIM domain is the PRY-SPRY or B30.2 domain, which has been proposed to be involved in protein–protein interactions and/or RNA binding (42).

Tripartite motif E3 ligases regulate many cellular processes, including development, cell growth, differentiation, cancer, and innate immune response (32, 43–45). Several TRIMs have been reported to exhibit antiviral activity either directly or through regulation of antiviral cell signaling (45–53).

TRIM25 REGULATES INTRACELLULAR SIGNALING

TRIM25 is a type I and type II IFN-inducible E3 ligase (54) that was first identified as an “estrogen-responsive finger protein” (EFP) (55). It is composed of a RING domain, two B-boxes domains, a CC dimerization domain and a C-terminal SPRY domain (**Figure 3**).

TRIM25 is involved in numerous cellular processes, such as development, cancer, and innate immunity (56). Regulation of RIG-I signaling by K63-linked polyubiquitination is one of the best-characterized roles of TRIM25 (57). Recognition of viral

RNA by RIG-I exposes its 2CARD domain for binding to the C-terminal SPRY domain of TRIM25 (**Figure 3**). The RING E3 ligase activity of TRIM25 then conjugates K63-polyubiquitin chains to residues K99, K169, K172, K181, K190, and K193 of RIG-I (57–59) (**Figure 3**). The K63-linked ubiquitin chains on RIG-I promotes its interaction with “mitochondrial antiviral signaling protein” (MAVS, also known as CARDIF, IPS1, or VISA) and subsequent downstream activation of intracellular antiviral signaling (57, 59, 60) (**Figure 3**). K172 seems to play a central role in this process, since the K172R mutation severely reduces ubiquitination of the CARD domain of RIG-I and subsequent binding to MAVS (57, 59). Interestingly, phosphorylation of the CARD domains of RIG-I prevents CARD ubiquitination, indicating that phosphatases need to first dephosphorylate CARD-RIG-I and allow TRIM25-mediated polyubiquitination (61–64). In addition to anchored ubiquitin, RIG-I can be activated by binding through its CARD domains to unanchored ubiquitin chains assembled by TRIM25 (30). Following RIG-I activation, TRIM25-mediated K48-linked ubiquitination and subsequent proteasomal degradation of the larger MAVS isoform seems to be required for the downstream signaling that leads to type I IFN (65), although other studies have shown opposite results (66) (**Figure 3**). Studies in mouse embryonic fibroblasts deficient in TRIM25 demonstrated its importance in RIG-I activation and IFN- β production in response to viral infection (57). All those experiments demonstrated the essential role of TRIM25 in RIG-I activation and signaling. Nevertheless, the RIPLET E3 ligase has also been shown to be involved in RIG-I polyubiquitination and sustained activation (67, 68). RIPLET, such as TRIM25, has an N-terminal RING domain and a C-terminal SPRY domain. However, RIPLET lacks B-box domains and does not belong to the TRIM family. Although it has been reported that RIPLET can mediate K63 polyubiquitination of K172 in the CARD domain of RIG-I (67), it does not seem that TRIM25 and RIPLET play a redundant role in the activation of RIG-I, since RIPLET mainly generates K63 ubiquitin chains in the RIG-I C-terminal regulatory domain (68, 69). Some redundancy in RIG-I activation by different TRIM proteins may, however, exist. For example, TRIM4, which belong to the same subgroup as TRIM25 in the TRIM protein family and share with it similar structural characteristics, can also target RIG-I for K63 polyubiquitination in K154, K164, and K172 of its CARD domain, which results in the activation IRF3 and NF- κ B, and IFN- β production (70).

TRIM25 may, however, have a dual role in RIG-I regulation, as it has been recently reported that TRIM25 negatively regulates RIG-I through stabilization of the ubiquitin-like protein FAT10. FAT10 non-covalently binds to RIG-I and sequesters it from the signaling platform inhibiting IRF3 and NF- κ B activation (71) (**Figure 3**). This mechanism may contribute to limit the inflammatory response and reduce host damage, since FAT10 is accumulated subsequently to production of inflammatory cytokines late during virus infections (71).

TRIM25 also functions as an E3 ligase to conjugate the ubiquitin-like protein ISG15 to target proteins in a process termed ISGylation (72). Furthermore, auto-ISGylation of TRIM25 negatively regulates its ISG15 E3 ligase activity (73) (**Figure 3**).

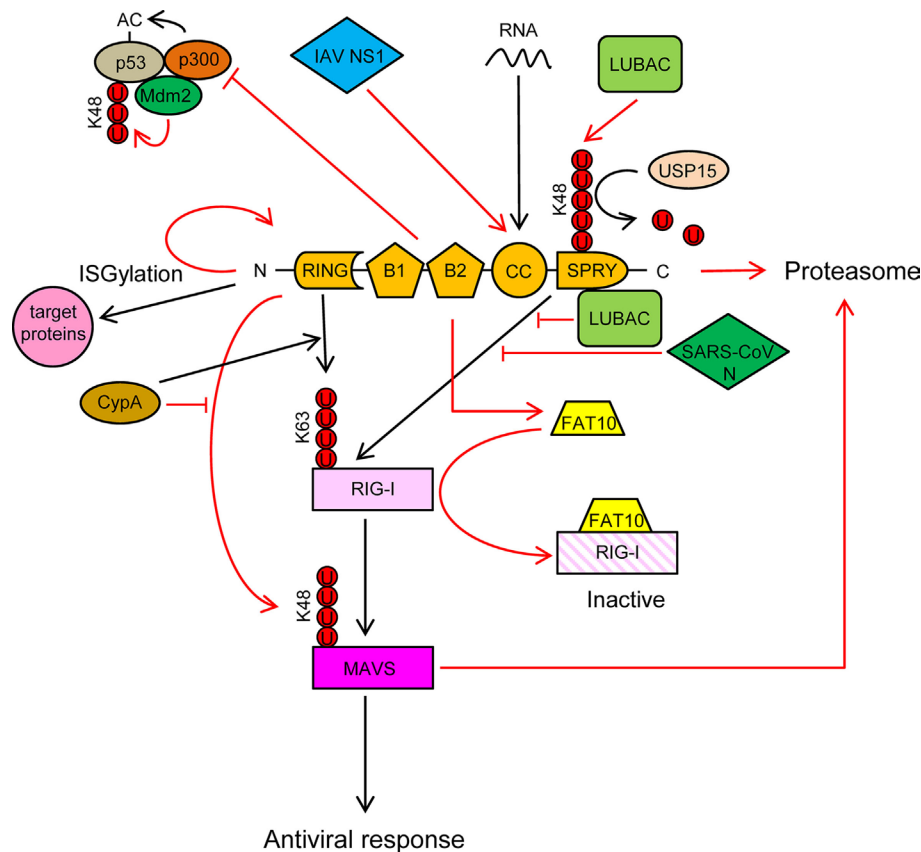


FIGURE 3 | TRIM25 participates in several innate immune-related processes and its activity is regulated by cellular and viral proteins. See text for detailed description of the individual processes. Ubiquitin molecules are represented by a U inside a red circle. Interactions and inhibitory processes are represented by red lines. The number of Us does not represent the actual level of ubiquitination.

More than 300 proteins, both cellular and pathogen-encoded, have been identified as targets for ISG15 conjugation (74). In general, ISGylation, as well as free ISG15, has broad-spectrum antiviral effects (75–83), although a pro-viral effect has been described in the case of hepatitis C virus (84–86). Furthermore, human ISG15 has been shown to stabilize USP18, a negative regulator of the type I IFN receptor (87). In addition, it has been reported that some viruses have developed mechanisms to counteract the antiviral actions of ISG15, reflecting the importance of this molecule in the response against virus infections (88, 89).

In addition to RIG-I, TRIM25 also positively regulates the melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA5)–MAVS–TRAF6 antiviral axis leading to activation of NF- κ B (90). Also, it has been recently reported that the antiviral action of zing-finger antiviral protein (ZAP), a cellular protein that inhibits viral mRNAs translation, is enhanced by interaction with the SPRY domain of TRIM25 (91, 92).

TRIM25 may also associate with p53, and it has been proposed that this association promotes p53 degradation, since TRIM25 silencing increased the accumulation of p53 and reduced proliferation and migration of lung cancer cells (93). By contrast, other study showed that TRIM25 enhanced p53 levels by preventing

their ubiquitination and proteasomal degradation (94). Despite increasing p53 levels, TRIM25 also inhibited p53 activity by preventing its acetylation by p300, an essential modification for the transcriptional activation of p53 target genes (Figure 3) (94). In any case, the regulation of p53 levels and/or activity by TRIM25 may have a deep impact on the innate immune response against infecting pathogens, as it has been reported that p53 upregulates the expression of interferon-stimulated genes (ISGs) either directly or through upregulation of IRF9, a component of the ISG factor 3 (ISGF3) (95–100).

An interesting observation is that TRIM25 can bind RNA through its central CC domain (101–103) (Figure 3). This opens new possibilities by which TRIM25 may influence intracellular signaling and/or replication of RNA viruses. It has been proposed that TRIM25 may use the RNA as a scaffold to get close to and modify its targets, including RIG-I and viral ribonucleoproteins (56). By contrast, as described below, some RNA viruses may take advantage of the capacity of TRIM25 to bind RNA to inhibit its function (104).

In conclusion, it is becoming evident that TRIM25 acts on multiple steps of signaling pathways inside the cell. Both positive and negative regulations of these pathways have been reported, adding complexity and relevance to the role of TRIM25 in the

intracellular innate response. Pieces of evidence of the physiological relevance of TRIM25 *in vivo*, however, are indirect. For example, *TRIM25* polymorphisms have been associated with differences in the humoral response and secretion of some cytokines following measles virus vaccination in children (105); and, as described below, particular virus infections of mice also suggest a role of TRIM25 in regulating RIG-I *in vivo* (66, 106). Finally, the fact that TRIM25 has been under positive selection pressure in primates (107, 108) and that it is targeted by some viral proteins (see next section) also indicates an important role of this molecule in the *in vivo* immunity against viruses.

TRIM25 ACTIVITY IS CONTROLLED BY CELLULAR AND VIRAL PROTEINS

A strong innate immune response, including RIG-I-mediated signaling, is necessary for virus clearance but it has to be tightly regulated to prevent excessive inflammation. Therefore, it is not surprising that immune signaling pathways are regulated by numerous positive and negative interactions, many of which are targeted by virus proteins in order to facilitate virus replication.

Cyclophilin A (CypA), a peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase, positively regulates RIG-I signaling by two different mechanisms (66): (a) CypA promotes the interaction between RIG-I and TRIM25, which results in increased TRIM25-mediated K63-linked ubiquitination and activation of RIG-I (**Figure 3**) and (b) CypA competes with TRIM25 for the interaction with MAVS, which reduces TRIM25-induced K48-linked ubiquitination and proteasomal degradation of MAVS (**Figure 3**). Accordingly, infection of CypA knockout (KO) mice with Sendai virus resulted in reduced expression of type I IFNs and ISGs, higher viral load, and severer histopathology in lungs, as compared with wild-type infections (66). However, it remains to be elucidated whether these *in vivo* effects in KO mice are mediated by the lack of the CypA-dependent regulation of TRIM25 activity or by a different mechanism.

The linear ubiquitination assembly complex (LUBAC), composed of the E3 ligases heme-oxidized IRP2 ubiquitin ligase-1 (HOIL-1L) and HOIL-1-interacting protein (HOIP), negatively regulates RIG-I signaling using two different mechanisms (109): (a) LUBAC ubiquitinates the C-terminal SPRY domain of TRIM25, leading to TRIM25 degradation by the proteasome (**Figure 3**). TRIM25 ubiquitination depends on the RBR (RING-IBR-RING) domains of both HOIL-1L and HOIP; (b) The Npl4-type zinc finger (NZF) domain of HOIL-1L competes with TRIM25 for RIG-I interaction, thereby blocking ubiquitination and activation of RIG-I by TRIM25 (109) (**Figure 3**). Recently, the ubiquitin-specific protease 15 (USP15), a TRIM25-interacting protein, was reported to neutralize the inhibitory effect of LUBAC (110). USP15 binds to TRIM25 in viral infections, detaching the K48-linked ubiquitin chains assembled by LUBAC on TRIM25, thereby stabilizing the TRIM25 protein levels and promoting a sustained antiviral response (**Figure 3**).

TRK-fused gene (TFG) protein, which is another protein that interacts with TRIM25, has also been reported to inhibit the

antiviral signaling mediated by RIG-I, although it is not sure that the interaction between TFG and TRIM25 itself is imperative for that effect (111).

It has been reported that some viral proteins are able to interact with TRIM25 and inhibit RIG-I activation. For example, the non-structural protein 1 (NS1) of influenza A virus (IAV) interacts with the CC domain of TRIM25 preventing its dimerization and K63-linked ubiquitination of the RIG-I CARDs, thereby suppressing RIG-I signal transduction (60, 106, 112) (**Figure 3**). This interaction seems to be mediated by residues E96/E97 in NS1, since an E96A/E97A NS1 mutant cannot interact with TRIM25, and also did not inhibit ubiquitination-mediated RIG-I signaling (106). Interestingly, in contrast to the wild-type virus, the E96A/E97A NS1 mutant was not virulent in mice (106). Since residues 96 and 97 have not been associated with other NS1 functions, it is tempting to speculate that the interaction between TRIM25 and NS1 is required for IAV virulence. In addition to its role in inhibiting RIG-I activation, the TRIM25-binding domain of IAV NS1 is needed for suppression of IL-1 β secretion mediated by NLRP3 in macrophages, suggesting that TRIM25 may also be involved in the activation of this pathway (113, 114).

Another example of TRIM25 regulation by viral proteins is the N proteins of the severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV), which binds to the SPRY domain of TRIM25, thereby inhibiting activation of RIG-I by TRIM25 ubiquitination (115) (**Figure 3**).

Finally, it has been recently reported that subgenomic RNA from dengue virus binds TRIM25, preventing its USP15-dependent deubiquitination necessary for efficient RIG-I activation (104).

CONCLUDING REMARKS

Emerging data show that the mechanisms by which TRIM25 may modulate the innate immune response against viruses are multiple and more complex than previously thought. TRIM25 has a dual role in RIG-I regulation: while TRIM25-mediated ubiquitination of RIG-I is essential for the transmission of downstream signaling, TRIM25 stabilization of FAT10 blocks active RIG-I. In addition, TRIM25 inhibits p53 acetylation, a modification indispensable for p53 antiviral activity. Finally, the ability of TRIM25 to bind RNA suggests new lines of investigation to uncover additional mechanisms of action and potential targets of this molecule. This complexity also increases the opportunities to develop novel strategies to regulate the innate immune response in order to reduce viral replication and/or avoid undesired excessive inflammation.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MM-V: investigation, resources and data curation, visualization, and writing-original draft preparation. SR: funding acquisition, writing-review, and editing. LM and AG-S: writing-review and editing. IM: conceptualization, funding acquisition, investigation,

resources and data curation, project administration, supervision, visualization, writing-original draft preparation, writing-review, and editing.

FUNDING

We gratefully acknowledge financial support from Instituto de Salud Carlos III, grant numbers PI15CIII/00024 (IM),

PI14CIII/00011 (SR), and CD14/00002 (LM). AG-S laboratories are partly supported by NIH grants R33AI119304, R21AI129486, U19AI106754, P01AI097092, R01DA033773, R01AI088770, U19AI117873, U19AI118610, R01AI125524, U01AI124297, and R01AI127658, contract HHSN272201300023C and by CRIP (Center for Research on Influenza Pathogenesis), an NIAID funded Center of Excellence for Influenza Surveillance and Research (CEIRS, contract HHSN272201400008C).

REFERENCES

- Broz P, Monack DM. Newly described pattern recognition receptors team up against intracellular pathogens. *Nat Rev Immunol* (2013) 13:551–65. doi:10.1038/nri3479
- Creagh EM, O'Neill LA. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol* (2006) 27:352–7. doi:10.1016/j.it.2006.06.003
- Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* (2010) 140:805–20. doi:10.1016/j.cell.2010.01.022
- Sun L, Liu S, Chen ZJ. SnapShot: pathways of antiviral innate immunity. *Cell* (2010) 140(436–436):e432. doi:10.1016/j.cell.2010.01.041
- Pham AM, Tenoever BR. The IKK kinases: operators of antiviral signaling. *Viruses* (2010) 2:55–72. doi:10.3390/v2010055
- Sharma S, tenOever BR, Grandvaux N, Zhou GP, Lin R, Hiscott J. Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* (2003) 300:1148–51. doi:10.1126/science.1081315
- Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* (2011) 30:16–34. doi:10.3109/08830185.2010.529976
- Sen GC, Sarkar SN. The interferon-stimulated genes: targets of direct signaling by interferons, double-stranded RNA, and viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* (2007) 316:233–50. doi:10.1007/978-3-540-71329-6_12
- Jefferies C, Wynne C, Higgs R. Antiviral TRIMs: friend or foe in autoimmune and autoinflammatory disease? *Nat Rev Immunol* (2011) 11:617–25. doi:10.1038/nri3043
- Kato H, Fujita T. Autoimmunity caused by constitutive activation of cytoplasmic viral RNA sensors. *Cytokine Growth Factor Rev* (2014) 25:739–43. doi:10.1016/j.cytogfr.2014.08.003
- Smith S, Jefferies C. Role of DNA/RNA sensors and contribution to autoimmunity. *Cytokine Growth Factor Rev* (2014) 25:745–57. doi:10.1016/j.cytogfr.2014.07.019
- Davis ME, Gack MU. Ubiquitination in the antiviral immune response. *Virology* (2015) 47(9–480):52–65. doi:10.1016/j.virol.2015.02.033
- Harhaj EW, Dixit VM. Deubiquitinases in the regulation of NF-kappaB signaling. *Cell Res* (2011) 21:22–39. doi:10.1038/cr.2010.166
- Maelfait J, Beyaert R. Emerging role of ubiquitination in antiviral RIG-I signaling. *Microbiol Mol Biol Rev* (2012) 76:33–45. doi:10.1128/MMBR.05012-11
- Oshiumi H, Matsumoto M, Seta T. Ubiquitin-mediated modulation of the cytoplasmic viral RNA sensor RIG-I. *J Biochem* (2012) 151:5–11. doi:10.1093/jb/mvr111
- Zinngrebe J, Montinaro A, Peltzer N, Walczak H. Ubiquitin in the immune system. *EMBO Rep* (2014) 15:28–45. doi:10.1002/embr.201338025
- Baker RT, Board PG. The human ubiquitin gene family: structure of a gene and pseudogenes from the Ub B subfamily. *Nucleic Acids Res* (1987) 15:443–63. doi:10.1093/nar/15.2.443
- Ciechanover A, Elias S, Heller H, Herskho A. "Covalent affinity" purification of ubiquitin-activating enzyme. *J Biol Chem* (1982) 257:2537–42.
- Herskho A, Heller H, Elias S, Ciechanover A. Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem* (1983) 258:8206–14.
- Kerscher O, Felberbaum R, Hochstrasser M. Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* (2006) 22:159–80. doi:10.1146/annurev.cellbio.22.010605.093503
- Ye Y, Rape M. Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2009) 10:755–64. doi:10.1038/nrm2780
- Kirisako T, Kamei K, Murata S, Kato M, Fukumoto H, Kanie M, et al. A ubiquitin ligase complex assembles linear polyubiquitin chains. *EMBO J* (2006) 25:4877–87. doi:10.1038/sj.emboj.7601360
- Iwai K, Fujita H, Sasaki Y. Linear ubiquitin chains: NF-kappaB signalling, cell death and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2014) 15:503–8. doi:10.1038/nrm3836
- Tokunaga F, Iwai K. LUBAC, a novel ubiquitin ligase for linear ubiquitination, is crucial for inflammation and immune responses. *Microbes Infect* (2012) 14:563–72. doi:10.1016/j.micinf.2012.01.011
- Kulathu Y, Komander D. Atypical ubiquitylation – the unexplored world of polyubiquitin beyond Lys48 and Lys63 linkages. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2012) 13:508–23. doi:10.1038/nrm3394
- Dikic I, Wakatsuki S, Walters KJ. Ubiquitin-binding domains – from structures to functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2009) 10:659–71. doi:10.1038/nrm2767
- Hicke L, Schubert HL, Hill CP. Ubiquitin-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2005) 6:610–21. doi:10.1038/nrm1701
- Hurley JH, Lee S, Prag G. Ubiquitin-binding domains. *Biochem J* (2006) 399:361–72. doi:10.1042/BJ20061138
- Rajsbaum R, Versteeg GA, Schmid S, Maestre AM, Belicha-Villanueva A, Martinez-Romero C, et al. Unanchored K48-linked polyubiquitin synthesized by the E3-ubiquitin ligase TRIM6 stimulates the interferon-IK-Kepsilon kinase-mediated antiviral response. *Immunity* (2014) 40:880–95. doi:10.1016/j.immuni.2014.04.018
- Zeng W, Sun L, Jiang X, Chen X, Hou F, Adhikari A, et al. Reconstitution of the RIG-I pathway reveals a signaling role of unanchored polyubiquitin chains in innate immunity. *Cell* (2010) 141:315–30. doi:10.1016/j.cell.2010.03.029
- Joazeiro CA, Weissman AM. RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* (2000) 102:549–52. doi:10.1016/S0092-8674(00)00077-5
- Meroni G, Diez-Roux G. TRIM/RBCC, a novel class of 'single protein RING finger' E3 ubiquitin ligases. *Bioessays* (2005) 27:1147–57. doi:10.1002/bies.20304
- Berndsen CE, Wolberger C. New insights into ubiquitin E3 ligase mechanism. *Nat Struct Mol Biol* (2014) 21:301–7. doi:10.1038/nsmb.2780
- Kentsis A, Borden KL. Construction of macromolecular assemblages in eukaryotic processes and their role in human disease: linking RINGs together. *Curr Protein Pept Sci* (2000) 1:49–73. doi:10.2174/1389203003381478
- Metzger MB, Pruneda JN, Kleit RE, Weissman AM. RING-type E3 ligases: master manipulators of E2 ubiquitin-conjugating enzymes and ubiquitination. *Biochim Biophys Acta* (2014) 1843:47–60. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.05.026
- Massiah MA, Matts JA, Short KM, Simmons BN, Singireddy S, Yi Z, et al. Solution structure of the MID1 B-box2 CHC(D/C)C(2)H(2) zinc-binding domain: insights into an evolutionarily conserved RING fold. *J Mol Biol* (2007) 369:1–10. doi:10.1016/j.jmb.2007.03.017
- Massiah MA, Simmons BN, Short KM, Cox TC. Solution structure of the RBCC/TRIM B-box1 domain of human MID1: B-box with a RING. *J Mol Biol* (2006) 358:532–45. doi:10.1016/j.jmb.2006.02.009
- Diaz-Griffero F, Qin XR, Hayashi F, Kigawa T, Finzi A, Sarnak Z, et al. A B-box 2 surface patch important for TRIM5alpha self-association, capsid binding avidity, and retrovirus restriction. *J Virol* (2009) 83:10737–51. doi:10.1128/JVI.01307-09
- Li X, Yeung DF, Fiegen AM, Sodroski J. Determinants of the higher order association of the restriction factor TRIM5alpha and other tripartite motif (TRIM) proteins. *J Biol Chem* (2011) 286:27959–70. doi:10.1074/jbc.M111.260406
- Tao H, Simmons BN, Singireddy S, Jakkidi M, Short KM, Cox TC, et al. Structure of the MID1 tandem B-boxes reveals an interaction reminiscent

- of intermolecular ring heterodimers. *Biochemistry* (2008) 47:2450–7. doi:10.1021/bi7018496
41. Streich FC Jr, Ronchi VP, Connick JP, Haas AL. Tripartite motifs catalyze polyubiquitin chain formation through a cooperative allosteric mechanism. *J Biol Chem* (2013) 288:8209–21. doi:10.1074/jbc.M113.451567
 42. D'Cruz AA, Babon JJ, Norton RS, Nicola NA, Nicholson SE. Structure and function of the SPRY/B30.2 domain proteins involved in innate immunity. *Protein Sci* (2013) 22:1–10. doi:10.1002/pro.2185
 43. Hatakeyama S. TRIM proteins and cancer. *Nat Rev Cancer* (2011) 11:792–804. doi:10.1038/nrc3139
 44. Napolitano LM, Meroni G. TRIM family: pleiotropy and diversification through homomultimer and heteromultimer formation. *IUBMB Life* (2012) 64:64–71. doi:10.1002/iub.580
 45. Rajsbaum R, Garcia-Sastre A, Versteeg GA. TRIM immunity: the roles of the TRIM E3-ubiquitin ligase family in innate antiviral immunity. *J Mol Biol* (2014) 426:1265–84. doi:10.1016/j.jmb.2013.12.005
 46. Kawai T, Akira S. Regulation of innate immune signalling pathways by the tripartite motif (TRIM) family proteins. *EMBO Mol Med* (2011) 3:513–27. doi:10.1002/emmm.201100160
 47. Medrano LM, Rallon N, Berenguer J, Jimenez-Sousa MA, Soriano V, Aldamiz-Echevarria T, et al. Relationship of TRIM5 and TRIM22 polymorphisms with liver disease and HCV clearance after antiviral therapy in HIV/HCV coinfecting patients. *J Transl Med* (2016) 14:257. doi:10.1186/s12967-016-1005-7
 48. Nisole S, Stoye JP, Saib A. TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. *Nat Rev Microbiol* (2005) 3:799–808. doi:10.1038/nrmicro1248
 49. Ozato K, Shin DM, Chang TH, Morse HC III. TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity. *Nat Rev Immunol* (2008) 8:849–60. doi:10.1038/nri2413
 50. Santa-Marta M, de Brito PM, Godinho-Santos A, Goncalves J. Host factors and HIV-1 replication: clinical evidence and potential therapeutic approaches. *Front Immunol* (2013) 4:343. doi:10.3389/fimmu.2013.00343
 51. Uchil PD, Hinz A, Siegel S, Coenen-Stass A, Pertel T, Luban J, et al. TRIM protein-mediated regulation of inflammatory and innate immune signaling and its association with antiretroviral activity. *J Virol* (2013) 87:257–72. doi:10.1128/JVI.01804-12
 52. Versteeg GA, Rajsbaum R, Sanchez-Aparicio MT, Maestre AM, Valdiviezo J, Shi M, et al. The E3-ligase TRIM family of proteins regulates signaling pathways triggered by innate immune pattern-recognition receptors. *Immunity* (2013) 38:384–98. doi:10.1016/j.immuni.2012.11.013
 53. Yang C, Zhao X, Sun D, Yang L, Chong C, Pan Y, et al. Interferon alpha (IFN α)-induced TRIM22 interrupts HCV replication by ubiquitinating NS5A. *Cell Mol Immunol* (2016) 13:94–102. doi:10.1038/cmi.2014.131
 54. Carthagen L, Bergamaschi A, Luna JM, David A, Uchil PD, Margottin-Goguet F, et al. Human TRIM gene expression in response to interferons. *PLoS One* (2009) 4:e4894. doi:10.1371/journal.pone.0004894
 55. Inoue S, Orimo A, Hosoi T, Kondo S, Toyoshima H, Kondo T, et al. Genomic binding-site cloning reveals an estrogen-responsive gene that encodes a RING finger protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1993) 90:11117–21. doi:10.1073/pnas.90.23.11117
 56. Heikel G, Choudhury NR, Michlewski G. The role of Trim25 in development, disease and RNA metabolism. *Biochem Soc Trans* (2016) 44:1045–50. doi:10.1042/BST20160077
 57. Gack MU, Shin YC, Joo CH, Urano T, Liang C, Sun L, et al. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature* (2007) 446:916–20. doi:10.1038/nature05732
 58. D'Cruz AA, Kershaw NJ, Chiang JJ, Wang MK, Nicola NA, Babon JJ, et al. Crystal structure of the TRIM25 B30.2 (PRYSPRY) domain: a key component of antiviral signalling. *Biochem J* (2013) 456:231–40. doi:10.1042/BJ20121425
 59. Gack MU, Kirchhofer A, Shin YC, Inn KS, Liang C, Cui S, et al. Roles of RIG-I N-terminal tandem CARD and splice variant in TRIM25-mediated antiviral signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2008) 105:16743–8. doi:10.1073/pnas.0804947105
 60. Rajsbaum R, Albrecht RA, Wang MK, Maharaj NP, Versteeg GA, Nistal-Villan E, et al. Species-specific inhibition of RIG-I ubiquitination and IFN induction by the influenza A virus NS1 protein. *PLoS Pathog* (2012) 8:e1003059. doi:10.1371/journal.ppat.1003059
 61. Gack MU, Nistal-Villan E, Inn KS, Garcia-Sastre A, Jung JU. Phosphorylation-mediated negative regulation of RIG-I antiviral activity. *J Virol* (2010) 84:3220–9. doi:10.1128/JVI.02241-09
 62. Maharaj NP, Wies E, Stoll A, Gack MU. Conventional protein kinase C- α (PKC- α) and PKC- β negatively regulate RIG-I antiviral signal transduction. *J Virol* (2012) 86:1358–71. doi:10.1128/JVI.06543-11
 63. Nistal-Villan E, Gack MU, Martinez-Delgado G, Maharaj NP, Inn KS, Yang H, et al. Negative role of RIG-I serine 8 phosphorylation in the regulation of interferon- β production. *J Biol Chem* (2010) 285:20252–61. doi:10.1074/jbc.M109.089912
 64. Wies E, Wang MK, Maharaj NP, Chen K, Zhou S, Finberg RW, et al. Dephosphorylation of the RNA sensors RIG-I and MDA5 by the phosphatase PP1 is essential for innate immune signaling. *Immunity* (2013) 38:437–49. doi:10.1016/j.immuni.2012.11.018
 65. Castanier C, Zemirli N, Portier A, Garcin D, Bidere N, Vazquez A, et al. MAVS ubiquitination by the E3 ligase TRIM25 and degradation by the proteasome is involved in type I interferon production after activation of the antiviral RIG-I-like receptors. *BMC Biol* (2012) 10:44. doi:10.1186/1741-7007-10-44
 66. Liu W, Li J, Zheng W, Shang Y, Zhao Z, Wang S, et al. Cyclophilin A-regulated ubiquitination is critical for RIG-I-mediated antiviral immune responses. *Elife* (2017) 6:e24425. doi:10.7554/eLife.24425
 67. Gao D, Yang YK, Wang RP, Zhou X, Diao FC, Li MD, et al. REUL is a novel E3 ubiquitin ligase and stimulator of retinoic-acid-inducible gene-1. *PLoS One* (2009) 4:e5760. doi:10.1371/journal.pone.0005760
 68. Oshiumi H, Matsumoto M, Hatakeyama S, Seya T. Riplet/RNF135, a RING finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon- β induction during the early phase of viral infection. *J Biol Chem* (2009) 284:807–17. doi:10.1074/jbc.M804259200
 69. Oshiumi H, Miyashita M, Inoue N, Okabe M, Matsumoto M, Seya T. The ubiquitin ligase Riplet is essential for RIG-I-dependent innate immune responses to RNA virus infection. *Cell Host Microbe* (2010) 8:496–509. doi:10.1016/j.chom.2010.11.008
 70. Yan J, Li Q, Mao AP, Hu MM, Shu HB. TRIM4 modulates type I interferon induction and cellular antiviral response by targeting RIG-I for K63-linked ubiquitination. *J Mol Cell Biol* (2014) 6:154–63. doi:10.1093/jmcb/mju005
 71. Nguyen NT, Now H, Kim WJ, Kim N, Yoo JY. Ubiquitin-like modifier FAT10 attenuates RIG-I mediated antiviral signaling by segregating activated RIG-I from its signaling platform. *Sci Rep* (2016) 6:23377. doi:10.1038/srep23377
 72. Zou W, Zhang DE. The interferon-inducible ubiquitin-protein isopeptide ligase (E3) EFP also functions as an ISG15 E3 ligase. *J Biol Chem* (2006) 281:3989–94. doi:10.1074/jbc.M510787200
 73. Zou W, Wang J, Zhang DE. Negative regulation of ISG15 E3 ligase EFP through its autoISGylation. *Biochem Biophys Res Commun* (2007) 354:321–7. doi:10.1016/j.bbrc.2006.12.210
 74. Durfee LA, Lyon N, Seo K, Huibregtse JM. The ISG15 conjugation system broadly targets newly synthesized proteins: implications for the antiviral function of ISG15. *Mol Cell* (2010) 38:722–32. doi:10.1016/j.molcel.2010.05.002
 75. Gonzalez-Sanz R, Mata M, Bermejo-Martin J, Alvarez A, Cortijo J, Melero JA, et al. ISG15 is upregulated in respiratory syncytial virus infection and reduces virus growth through protein ISGylation. *J Virol* (2016) 90:3428–38. doi:10.1128/JVI.02695-15
 76. Guerra S, Caceres A, Knobeloch KP, Horak I, Esteban M. Vaccinia virus E3 protein prevents the antiviral action of ISG15. *PLoS Pathog* (2008) 4:e1000096. doi:10.1371/journal.ppat.1000096
 77. Hishiki T, Han Q, Arimoto K, Shimotohno K, Igarashi T, Vasudevan SG, et al. Interferon-mediated ISG15 conjugation restricts dengue virus 2 replication. *Biochem Biophys Res Commun* (2014) 448:95–100. doi:10.1016/j.bbrc.2014.04.081
 78. Lenschow DJ, Lai C, Frias-Staheli N, Giannakopoulos NV, Lutz A, Wolff T, et al. IFN-stimulated gene 15 functions as a critical antiviral molecule against influenza, herpes, and Sindbis viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2007) 104:1371–6. doi:10.1073/pnas.0607038104
 79. Ma XZ, Bartczak A, Zhang J, He W, Shalev I, Smil D, et al. Protein interferon-stimulated gene 15 conjugation delays but does not overcome coronavirus proliferation in a model of fulminant hepatitis. *J Virol* (2014) 88:6195–204. doi:10.1128/JVI.03801-13
 80. Okumura A, Lu G, Pitha-Rowe I, Pitha PM. Innate antiviral response targets HIV-1 release by the induction of ubiquitin-like protein ISG15. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2006) 103:1440–5. doi:10.1073/pnas.0510518103
 81. Okumura A, Pitha PM, Harty RN. ISG15 inhibits Ebola VP40 VLP budding in an L-domain-dependent manner by blocking Nedd4 ligase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2008) 105:3974–9. doi:10.1073/pnas.0710629105

82. Werneke SW, Schilte C, Rohatgi A, Monte KJ, Michault A, Arenzana-Seisdedos F, et al. ISG15 is critical in the control of Chikungunya virus infection independent of UBE1L mediated conjugation. *PLoS Pathog* (2011) 7: e1002322. doi:10.1371/journal.ppat.1002322
83. Yanguez E, Garcia-Culebras A, Frau A, Llopart C, Knobloch KP, Gutierrez-Erlandsson S, et al. ISG15 regulates peritoneal macrophages functionality against viral infection. *PLoS Pathog* (2013) 9: e1003632. doi:10.1371/journal.ppat.1003632
84. Broering R, Zhang X, Kottlil S, Trippier M, Jiang M, Lu M, et al. The interferon stimulated gene 15 functions as a proviral factor for the hepatitis C virus and as a regulator of the IFN response. *Gut* (2010) 59:1111–9. doi:10.1136/gut.2009.195545
85. Chen L, Sun J, Meng L, Heathcote J, Edwards AM, McGilvray ID. ISG15, a ubiquitin-like interferon-stimulated gene, promotes hepatitis C virus production in vitro: implications for chronic infection and response to treatment. *J Gen Virol* (2010) 91:382–8. doi:10.1099/vir.0.015388-0
86. Real CI, Megger DA, Sitek B, Jahn-Hofmann K, Ickenstein LM, John MJ, et al. Identification of proteins that mediate the pro-viral functions of the interferon stimulated gene 15 in hepatitis C virus replication. *Antiviral Res* (2013) 100:654–61. doi:10.1016/j.antiviral.2013.10.009
87. Zhang X, Bogunovic D, Payelle-Brogard B, Francois-Newton V, Speer SD, Yuan C, et al. Human intracellular ISG15 prevents interferon-alpha/beta over-amplification and auto-inflammation. *Nature* (2015) 517:89–93. doi:10.1038/nature13801
88. Eduardo-Correia B, Martinez-Romero C, Garcia-Sastre A, Guerra S. ISG15 is counteracted by vaccinia virus E3 protein and controls the proinflammatory response against viral infection. *J Virol* (2014) 88:2312–8. doi:10.1128/JVI.03293-13
89. Yuan W, Krug RM. Influenza B virus NS1 protein inhibits conjugation of the interferon (IFN)-induced ubiquitin-like ISG15 protein. *EMBO J* (2001) 20:362–71. doi:10.1093/emboj/20.3.362
90. Lee NR, Kim HI, Choi MS, Yi CM, Inn KS. Regulation of MDA5-MAVS antiviral signaling axis by TRIM25 through TRAF6-mediated NF-kappaB activation. *Mol Cells* (2015) 38:759–64. doi:10.14348/molcells.2015.0047
91. Li MM, Lau Z, Cheung P, Aguilar EG, Schneider WM, Bozzacco L, et al. TRIM25 enhances the antiviral action of zinc-finger antiviral protein (ZAP). *PLoS Pathog* (2017) 13: e1006145. doi:10.1371/journal.ppat.1006145
92. Zheng X, Wang X, Tu F, Wang Q, Fan Z, Gao G. TRIM25 is required for the antiviral activity of zinc finger antiviral protein. *J Virol* (2017) 91: e88–17. doi:10.1128/JVI.00088-17
93. Qin Y, Cui H, Zhang H. Overexpression of TRIM25 in lung cancer regulates tumor cell progression. *Technol Cancer Res Treat* (2016) 15:707–15. doi:10.1177/1533034615595903
94. Zhang P, Elabd S, Hammer S, Solozobova V, Yan H, Bartel F, et al. TRIM25 has a dual function in the p53/Mdm2 circuit. *Oncogene* (2015) 34:5729–38. doi:10.1038/ncr.2015.21
95. Hummer BT, Li XL, Hassel BA. Role for p53 in gene induction by double-stranded RNA. *J Virol* (2001) 75:7774–7. doi:10.1128/JVI.75.16.7774-7777.2001
96. Mori T, Anazawa Y, Iizumi M, Fukuda S, Nakamura Y, Arakawa H. Identification of the interferon regulatory factor 5 gene (IRF-5) as a direct target for p53. *Oncogene* (2002) 21:2914–8. doi:10.1038/sj.onc.1205459
97. Munoz-Fontela C, Macip S, Martinez-Sobrido L, Brown L, Ashour J, Garcia-Sastre A, et al. Transcriptional role of p53 in interferon-mediated antiviral immunity. *J Exp Med* (2008) 205:1929–38. doi:10.1084/jem.20080383
98. Rivas C, Aaronson SA, Munoz-Fontela C. Dual role of p53 in innate antiviral immunity. *Viruses* (2010) 2:298–313. doi:10.3390/v2010298
99. Takaoka A, Hayakawa S, Yanai H, Stoiber D, Negishi H, Kikuchi H, et al. Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *Nature* (2003) 424:516–23. doi:10.1038/nature01850
100. Taura M, Eguma A, Suico MA, Shuto T, Koga T, Komatsu K, et al. p53 regulates toll-like receptor 3 expression and function in human epithelial cell lines. *Mol Cell Biol* (2008) 28:6557–67. doi:10.1128/MCB.01202-08
101. Beckmann BM, Horos R, Fischer B, Castello A, Eichelbaum K, Alleaume AM, et al. The RNA-binding proteomes from yeast to man harbour conserved enigmRBPs. *Nat Commun* (2015) 6:10127. doi:10.1038/ncomms10127
102. Castello A, Fischer B, Eichelbaum K, Horos R, Beckmann BM, Strein C, et al. Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins. *Cell* (2012) 149:1393–406. doi:10.1016/j.cell.2012.04.031
103. Kwon SC, Yi H, Eichelbaum K, Fohr S, Fischer B, You KT, et al. The RNA-binding protein repertoire of embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol* (2013) 20:1122–30. doi:10.1038/nsmb.2638
104. Manokaran G, Finol E, Wang C, Gunaratne J, Bahl J, Ong EZ, et al. Dengue subgenomic RNA binds TRIM25 to inhibit interferon expression for epidemiological fitness. *Science* (2015) 350:217–21. doi:10.1126/science.aab3369
105. Ovsyannikova IG, Haralambieva IH, Vierkant RA, O'Byrne MM, Poland GA. Associations between polymorphisms in the antiviral TRIM genes and measles vaccine immunity. *Hum Immunol* (2013) 74:768–74. doi:10.1016/j.humimm.2013.01.031
106. Gack MU, Albrecht RA, Urano T, Inn KS, Huang IC, Carnero E, et al. Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by the host viral RNA sensor RIG-I. *Cell Host Microbe* (2009) 5:439–49. doi:10.1016/j.chom.2009.04.006
107. Han K, Lou DI, Sawyer SL. Identification of a genomic reservoir for new TRIM genes in primate genomes. *PLoS Genet* (2011) 7: e1002388. doi:10.1371/journal.pgen.1002388
108. Malfavon-Borja R, Sawyer SL, Wu LI, Emerman M, Malik HS. An evolutionary screen highlights canonical and noncanonical candidate antiviral genes within the primate TRIM gene family. *Genome Biol Evol* (2013) 5:2141–54. doi:10.1093/gbe/evt163
109. Inn KS, Gack MU, Tokunaga F, Shi M, Wong LY, Iwai K, et al. Linear ubiquitin assembly complex negatively regulates RIG-I- and TRIM25-mediated type I interferon induction. *Mol Cell* (2011) 41:354–65. doi:10.1016/j.molcel.2010.12.029
110. Pauli EK, Chan YK, Davis ME, Gableske S, Wang MK, Feister KF, et al. The ubiquitin-specific protease USP15 promotes RIG-I-mediated antiviral signaling by deubiquitylating TRIM25. *Sci Signal* (2014) 7: ra3. doi:10.1126/scisignal.2004577
111. Lee NR, Shin HB, Kim HI, Choi MS, Inn KS. Negative regulation of RIG-I-mediated antiviral signaling by TRK-fused gene (TFG) protein. *Biochem Biophys Res Commun* (2013) 437:168–72. doi:10.1016/j.bbrc.2013.06.061
112. Sanchez-Aparicio MT, Ayllon J, Leo-Macias A, Wolff T, Garcia-Sastre A. Subcellular localizations of RIG-I, TRIM25 and MAVS complexes. *J Virol* (2016) 91: e1155–1116. doi:10.1128/JVI.01155-16
113. Moriyama M, Chen IY, Kawaguchi A, Koshiba T, Nagata K, Takeyama H, et al. The RNA- and TRIM25-binding domains of influenza virus NS1 protein are essential for suppression of NLRP3 inflammasome-mediated interleukin-1beta secretion. *J Virol* (2016) 90:4105–14. doi:10.1128/JVI.00120-16
114. Pothlichet J, Meunier I, Davis BK, Ting JP, Skamene E, von Messling V, et al. Type I IFN triggers RIG-I/TLR3/NLRP3-dependent inflammasome activation in influenza A virus infected cells. *PLoS Pathog* (2013) 9: e1003256. doi:10.1371/journal.ppat.1003256
115. Hu Y, Li W, Gao T, Cui Y, Jin Y, Li P, et al. The severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid inhibits type I interferon production by interfering with TRIM25-mediated RIG-I ubiquitination. *J Virol* (2017) 91: e2143–2116. doi:10.1128/JVI.02143-16

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Martín-Vicente, Medrano, Resino, García-Sastre and Martínez. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Research paper

Genetic variants upstream of TNFAIP3 in the 6q23 region are associated with liver disease severity in HIV/HCV-coinfected patients: A cross-sectional study



María A. Jiménez-Sousa^{a,*}, Juan Berenguer^{b,c}, Amanda Fernández-Rodríguez^a, Luz María Medrano^a, Teresa Aldámiz-Echevarria^{b,c}, Leire Pérez-Latorre^{b,c}, Cristina Díez^{b,c}, María Martín-Vicente^a, Mónica Gutiérrez-Rivas^a, Isidoro Martínez^{a,1}, Salvador Resino^{a,*,1}

^a Unidad de Infección Viral e Inmunidad, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain

^b Unidad de Enfermedades Infecciosas/VIH, Hospital General Universitario “Gregorio Marañón”, Madrid, Spain

^c Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (IISGM), Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

AIDS
Chronic hepatitis C
TNFAIP3
SNPs
Liver fibrosis
Inflammation

ABSTRACT

Background: TNFAIP3 is a crucial hepatoprotective factor due to its anti-inflammatory, anti-apoptotic, anti-oxidant and pro-regenerative functions. The aim of this study was to analyze the associations between genetic variants upstream of *TNFAIP3* (rs675520, rs9376293 and rs6920220) and liver fibrosis severity and inflammation in HIV/HCV-coinfected patients.

Methods: A cross-sectional study was carried out in 215 HIV/HCV-coinfected patients, who underwent a liver biopsy. *TNFAIP3* polymorphisms were genotyped using GoldenGate® assay. Outcome variables were: a) liver fibrosis (Metavir score) [fibrosis stage (F0, F1, F2, F3 and F4) and advanced fibrosis and cirrhosis (F ≥ 3 and F4, respectively)]; b) non-invasive indexes [FIB-4, APRI, and their cut-offs (FIB-4 ≥ 3.25 and APRI ≥ 1.5)]; c) inflammation-related biomarkers (leptin, HGF, NGF, sFasL, sFas, MIF, HA, Ang-2, TIMP1, MMP1 and MMP2).

Results: Patients with rs675520 AG/GG genotypes had decreased odds of having cirrhosis (F4) and advanced fibrosis (FIB-4 ≥ 3.25 and APRI ≥ 1.5) [adjusted Odds Ratio (aOR) = 0.30 (p = 0.025), aOR = 0.20 (p = 0.014), and aOR = 0.34 (p = 0.017), respectively] and lower levels of FIB-4 and APRI [adjusted arithmetic mean ratio (aAMR) = 0.76 (p = 0.003) and aAMR = 0.72 (p = 0.006), respectively]. Patients with rs9376293 CT/CC genotypes had decreased odds of APRI ≥ 1.5 [aOR = 0.39 (p = 0.030)] and lower levels of APRI [aAMR = 0.77 (p = 0.018)]. Patients with rs6920220 AG/AA genotypes had higher odds of having FIB-4 ≥ 3.25 [aOR = 3.72 (p = 0.043)]. Moreover, rs675520 AG/GG genotypes, compared to AA genotype, were associated with lower levels of leptin and NGF (p = 0.002 and p = 0.001, respectively) and higher levels of sFas, MIF, TIMP1 and MMP2 (p = 0.004, p = 0.007, p = 0.020 and p = 0.036, respectively). Also, rs9376293 CT/CC genotypes were related to lower leptin levels (p = 0.026) and higher sFas, MIF, TIMP1 and MMP2 levels (p = 0.029, p = 0.040, p = 0.022 and p = 0.024, respectively).

Conclusions: Genetic variants upstream of *TNFAIP3* were associated with the liver fibrosis severity and inflammation in HIV/HCV-coinfected patients.

1. Introduction

Chronic hepatitis C (CHC) is linked to an important morbidity and mortality, mainly due to the development of liver fibrosis and its evolution towards cirrhosis and hepatocarcinoma (Mengshol et al., 2007; Heim and Thimme, 2014). Several factors may accelerate the risk of

these complications such as age at infection, sex, route of infection, hepatitis C virus (HCV) genotype and obesity, among others (Ortiz et al., 2002; Rotman and Liang, 2009; Rueger et al., 2015). Additionally, human immunodeficiency virus (HIV) infection has a negative impact on the natural history of CHC in HIV/HCV coinfected patients, promoting the risk of fibrosis and cirrhosis, and being an

* Corresponding authors at: Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III (Campus Majadahonda), Carretera Majadahonda- Pozuelo, Km 2.2, Majadahonda, Madrid 28220, Spain.

E-mail addresses: jimenezsousa@isciii.es (M.A. Jiménez-Sousa), sresino@isciii.es (S. Resino).

¹ Both authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.10.008>

Received 7 September 2018; Received in revised form 11 October 2018; Accepted 12 October 2018

Available online 15 October 2018

1567-1348/© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

significant cause of morbidity and death in this group of patients (Lopez-Dieguez et al., 2011; Macias et al., 2009).

HCV infection modulates host antiviral immune response leading to chronic inflammation and thus promotes liver fibrogenesis (Friedman, 2010). Both antiviral and inflammatory responses are necessary for the control of HCV infection, but they have to be tightly regulated to avoid excessive inflammation and host liver damage. These responses are regulated to a great extent by processes of ubiquitination/deubiquitination of different proteins. Tumor necrosis factor alpha induced protein 3 (TNFAIP3) is a key player in the negative regulation of these pathways by its dual function as both a deubiquitinase and a ubiquitin ligase (Arguello et al., 2014). HCV core protein has been shown to induce *TNFAIP3* expression in macrophages, which results in inefficient M1 macrophage polarization and cytokine balance dysregulation leading to low-grade chronic inflammation during HCV infection (Song et al., 2016; Fan et al., 2015). Overexpression of *TNFAIP3* may also promote immune suppression via dendritic cells (DCs) (Breckpot et al., 2009; Song et al., 2008), and negatively regulate myeloid DC function in patients with CHC (Ma et al., 2014).

In addition, TNFAIP3 has been described as a crucial hepatoprotective factor due to multiple functions: a) anti-inflammatory effects, via a blockade of nuclear factor- κ B (NF- κ B) activation in response to several pro-inflammatory mediators; b) anti-apoptotic effects, by inhibiting pro-caspase 8 cleavage and preserving mitochondrial integrity; c) anti-oxidant effects, by leading to higher expression of Peroxisome Proliferator Activated Receptor alpha and improved energy production, as well as limiting reactive oxygen species formation; and d) pro-regenerative effects, by decreasing the expression of cell cycle inhibitors and increasing IL6/STAT3 proliferative signals (da Silva et al., 2014).

Several single nucleotide polymorphisms (SNPs) around the *TNFAIP3* gene have an important role in susceptibility to inflammatory and autoimmune diseases, including rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, inflammatory bowel disease, juvenile idiopathic arthritis, coeliac disease, psoriasis, coronary artery disease in type 2 diabetes, systemic sclerosis, type I diabetes and Sjogren's syndrome (Mele et al., 2014; Coenen et al., 2009; Stuart et al., 2015; Wang et al., 2016; Zhang et al., 2016a; Zhang et al., 2016b). Also, some articles have described a significant association between *TNFAIP3* polymorphisms and changes in *TNFAIP3* mRNA expression (Ungerback et al., 2012). Some of these polymorphisms, including those reported in the present study, are located in a non-coding region upstream of *TNFAIP3* and oligodendrocyte transcription factor 3 (*OLIG3*) in 6q23. *OLIG3* is a basic helix-loop-helix transcription factor with known implications in the development of the nervous system (Liu et al., 2008). However, these SNPs have been related to *TNFAIP3* rather than the *OLIG3* gene due to its implication in inflammation and immunity (Zhu et al., 2015).

The objective of this study was to investigate the associations between genetic variants upstream of *TNFAIP3* (rs675520, rs9376293 and rs6920220) and liver fibrosis severity and inflammation in HIV/HCV-coinfected patients.

2. Material and methods

2.1. Patients and study design

A cross-sectional study was carried out in 215 HIV/HCV-coinfected patients, in whom liver disease was evaluated by liver biopsy from September 2000 to November 2008. The study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki and all involved patients signed the consent. The Research Ethic Committee and the Institutional Review Board of the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) gave their approval to our study.

Liver biopsies were performed on naïve patients who were potential candidates for anti-HCV therapy. Selection criteria were: detectable HCV RNA by polymerase chain reaction (PCR), no clinical evidence of hepatic decompensation and availability of a DNA sample, CD4+

lymphocyte count > 200 cells/ μ L, and stable combination anti-retroviral therapy (cART) or no need for cART for at least 6 months before study entry according to treatment guidelines (Panel de expertos de Gesida Plan Nacional sobre el Sida y Asociación Española para el Estudio del Hígado, 2010; Ghany et al., 2009). Patients with positive hepatitis B surface antigen, active opportunistic infections, active drug addiction, and other concomitant severe diseases were excluded. All patients included in this study were white of European descent.

2.2. Epidemiological and clinical data

Clinical and epidemiological data were obtained from medical records. Alcohol intake of > 50 g of alcohol per day for at least 12 months was considered as high intake. Body mass index (BMI) was calculated as the weight in kilograms divided by the square of the height in meters. The duration of HCV infection for patients with a history of intravenous drug use was estimated as starting from the first year they shared needles and other injection paraphernalia, which are the most relevant risk practices for HCV transmission.

2.3. Liver biopsy

Liver biopsies were carried out as previously described by our group (Resino et al., 2011). Fibrosis and necroinflammatory activity stage were estimated according to Metavir score as follows: F0, no fibrosis; F1, mild fibrosis; F2, significant fibrosis; F3, advanced fibrosis; and F4, definite cirrhosis. The degree of necroinflammation (activity grade) was scored as follows: A0, no activity; A1, mild activity; A2, moderate activity; A3, severe activity. Liver steatosis was determined according to the existence of hepatocytes containing visible macrovesicular fat droplets, which was clinically significant when fatty hepatocytes exceeded 10% of hepatic parenchyma.

2.4. Biochemistry analysis

Biochemistry panel was measured from serum samples using a clinical chemistry analyzer (Hitachi 912, Boehringer Mannheim, Germany) in fasting patients.

Non-invasive liver fibrosis indexes were calculated according to the formula originally described for the Aspartate aminotransferase to platelet ratio index (APRI): [aspartate aminotransferase (AST)(U/L)/upper limit of normal for AST (ULN)]/[platelet [10^9 /L] \times 100]; and the fibrosis 4 index (FIB-4): [age (years) \times AST (U/L)]/[platelets (10^9 /L) \times [alanine aminotransferase (ALT) (U/L)]^{1/2}]. These non-invasive markers are robust tools to assess liver fibrosis with a potential role in disease management and clinical decision-making on patients (Resino et al., 2012).

The insulin resistance degree was determined for each patient using the homeostatic model assessment (HOMA): [fasting plasma glucose (mmol/L) \times fasting serum insulin (mU/L)]/22.5.

2.5. DNA genotyping

Total DNA was extracted from 200 μ L of peripheral blood with Qiagen kit (QIAamp DNA Blood Midi/Maxi; Qiagen, Hilden, Germany). Genetic variants upstream of *TNFAIP3* (rs675520, rs9376293 and rs6920220) were genotyped at the Spanish National Genotyping Center (CeGen). Genotyping was performed by Agena Bioscience's MassARRAY platform (San Diego, CA, USA) using the iPLEX® Gold assay design system. The genotyping process consists of two reactions. First, DNA fragments are amplified by multiplex PCR and second, the allelic discrimination reaction and first extension are carried out. In the iPLEX® Gold technology, all reactions end after a single base extension that generates a mass difference in the extension product according to the added base. This difference in mass is detected by MALDI-TOF mass spectrometry.

Frequencies of alleles and genotypes from healthy subjects for the studied polymorphisms were obtained using the 1000 Genomes Project website (<http://www.1000genomes.org/home>). This database contains a broad representation of common human genetic variations from multiple populations (Auton et al., 2015). We selected the Iberian populations in Spain (IBS) that included 107 individuals.

2.6. Plasma inflammation-related biomarkers

Multiplex kits (LINCOplex; LINCO Research, St Charles, MO, USA) were used to specifically evaluate six plasma biomarkers with the Luminex 100TM analyzer (Luminex Corporation, Austin, TX, United States). The plasma biomarkers analyzed were leptin, hepatocyte growth factor (HGF), nerve growth factor (NGF), soluble Fas-associated death domain protein ligand (sFasL), soluble Fas-associated death domain protein (sFas), and macrophage migration inhibitory factor (MIF).

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits were used to test the following six plasma biomarkers: hyaluronic acid (HA, HA-ELISA; Echelon Biosciences Inc., Salt Lake City, UT, USA), angiotensin-II (Ang-2, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP1), matrix metalloproteinase-1 (MMP1), matrix metalloproteinase-2 (MMP2) (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK), and chitinase 3 like 1 (CHI3L1) (Qidel Corporation, San Diego, CA, USA).

2.7. Outcome variables

We analyzed several outcome variables related to severity of liver disease, after a minimum follow-up time of 10 years with HCV infection, by using:

- Liver biopsy (Metavir score): fibrosis stage as ordinal variable (F0, F1, F2, F3 and F4) and advanced fibrosis and cirrhosis ($F \geq 3$ and F4, respectively) as dichotomous variable;
- Non-invasive fibrosis indexes: FIB-4 and APRI as quantitative variables and their cut-off points for advanced fibrosis ($FIB-4 \geq 3.25$ and $APRI \geq 1.5$) as dichotomous variable;
- Twelve Inflammation-related biomarkers: leptin, HGF, NGF, sFasL, sFas, MIF, HA, Ang-2, TIMP1, CHI3L1, MMP1, and MMP2.

2.8. Statistics

Chi-square test was conducted to analyze the differences in allelic and genotypic frequencies. For the genetic association study, statistical analysis was carried out according to additive, recessive and dominant models, selecting the model that best fit the outcome variable analyzed in each case. Generalized Linear Model (GLM) was used to investigate the relationship among genetic variants upstream of *TNFAIP3* and severity of liver disease (unadjusted and adjusted models), but depending on the outcome variable the used model was different: a) For continuous variables (FIB-4 and APRI): a GLM with a gamma distribution (log-link) was used. This test provides the differences between groups and the arithmetic mean ratio (AMR) or the ratio by which the arithmetic mean of the original outcome is multiplied. b) For categorical variables: a GLM with ordinal distribution (cumlogit link) and GLM with binomial distribution (logit-link) were used to investigate the association with ordinal (fibrosis stage) and dichotomous (F3, F4, $FIB-4 \geq 3.25$ and $APRI \geq 1.5$) outcome variables, respectively. This test provides the differences between groups and the odds ratio (OR) for categorical outcome variables. Each regression test was adjusted by gender, age, nadir CD4+ T-cells, time on cART, BMI, alcohol intake, AIDS, undetectable HIV-RNA (< 50 copies/ml), HCV genotype, HCV-RNA $\geq 500,000$ IU/ml, HOMA, and interleukin 28B (*IL28B*) rs12980275 and patatin like phospholipase domain containing 3 (*PNPLA3*) rs738409 polymorphisms. Additionally, GLM with a gamma distribution (log-link) was also used to investigate the association

between genetic variants near *TNFAIP3* and inflammation-related biomarkers. The co-variables used in the multivariate model were nadir CD4+ T-cells, CD4+ T-cells, time on cART, HIV-RNA (< 50 copies/ml) and HCV-RNA $\geq 500,000$ IU/ml; since these co-variables may very directly influence the plasma markers of inflammation.

All statistical tests were carried out with the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 21.0 software (IBM Corp., Chicago, USA). All p-values were two-sided and statistical significance was defined as p value < 0.05 .

In addition, Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) analyses and pairwise linkage disequilibrium (LD) analysis were computed by Haploview 4.2 software, considering equilibrium when $p > 0.05$. Haplotype-based association test was performed with Plink software (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>) and adjusted by the same variables as for association with individual SNPs. All p-values were two-tailed and statistical significance was defined as $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Patients and *TNFAIP3* polymorphisms

The summary of epidemiological and clinical characteristics of 215 HIV/HCV-coinfected patients at the time of liver biopsy is shown in Table 1.

All SNPs had a minimum allele frequency (MAF) $> 5\%$, displayed missing values $< 5\%$, and were in HWE ($p > 0.05$) (Table 2). The frequencies of rs675520, rs6920220 and rs9376293 were similar to those described for healthy IBS subjects and were in accordance with the data listed on the NCBI SNP database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>).

A high LD, defined as non-random association of alleles at different loci, among genetic variants upstream of *TNFAIP3* was found (Fig. 1), meaning that there is no evidence for recombination between these SNPs. However, the r-square among SNPs was low (r-square < 0.60 ; Fig. 1), meaning that genetic variants upstream of *TNFAIP3* do not provide the same information and cannot be substituted for each other.

3.2. Genetic variants upstream of *TNFAIP3* and liver disease

The dominant model of inheritance was the model that best fitted our data. Patients carrying rs675520 AG/GG had lower values of FIB-4 ($p = 0.027$; Fig. 2a1) and lower percentages of cirrhosis (F4) and advanced fibrosis ($FIB-4 \geq 3.25$ and $APRI \geq 1.5$) ($p = 0.037$, $p = 0.039$ and $p = 0.039$ respectively; Fig. 2a2) than carriers of AA genotype. Patients with rs9376293 CT/CC genotypes had lower values of APRI ($p = 0.030$; Fig. 2b1) and lower percentages of $APRI \geq 1.5$ ($p = 0.033$; Fig. 2b2) than carriers of TT genotype. Furthermore, patients with rs6920220 AG/AA genotypes had higher values of APRI ($p = 0.047$; Fig. 2c1) and higher percentages of F4, $FIB-4 \geq 3.25$ and $APRI \geq 1.5$ ($p = 0.047$, $p = 0.013$ and $p = 0.041$ respectively; Fig. 2c2) than carriers of GG genotype.

In multivariate analysis, rs675520 AG/GG was associated with decreased odds of having F4, $FIB-4 \geq 3.25$ and $APRI \geq 1.5$ [adjusted OR (aOR) = 0.30 ($p = 0.025$), aOR = 0.20 ($p = 0.014$), and aOR = 0.34 ($p = 0.017$); respectively] (Fig. 3A). In addition, the rs675520 AG/GG genotypes were significantly related to lower levels of FIB-4 and APRI [adjusted AMR (aAMR) = 0.76 ($p = 0.003$) and aAMR = 0.72 ($p = 0.006$); respectively] (Fig. 3A). When patients were stratified by HCV genotype, rs675520 AG/GG was related with decreased odds of having $FIB-4 \geq 3.25$ [aOR = 0.19 ($p = 0.035$)] and reduced levels of FIB-4 [aAMR = 0.77 ($p = 0.026$)] in patients with HCV genotype 1/4 (Fig. 3B). Regarding patients with HCV genotype 2/3, rs675520 AG/GG was associated with decreased odds of having $F \geq 3$ [aOR = 0.08 ($p = 0.028$)] and advanced fibrosis stage according to Metavir score [aOR = 0.25 ($p = 0.044$)], and lower levels of FIB-4 and APRI [aAMR = 0.75 ($p = 0.031$), and aAMR = 0.67 ($p = 0.013$),

Table 1
Clinical and epidemiological characteristics of HIV/HCV-coinfected patients.

Characteristics	All patients
Total No. or patients	215
Male	161 (74.9%)
Age, years	39.8 (37.5; 44.1)
Epidemiological history	
HIV acquired by IVDU	190 (88.4%)
Years since HCV infection (n = 200)	21.4 (17.1; 24.4)
High alcohol intake (> 50 g per day)	116 (54.2%)
CDC category C	59 (27.4%)
Metabolic markers	
BMI, kg/m ²	22.3 (20.8; 24.5)
BMI ≥ 25 kg/m ²	46 (21.6%)
HOMA	2.10 (1.27; 3.68)
HOMA ≥ 3	68 (32.9%)
Antiretroviral therapy	
cART,	178 (82.8%)
Time on cART, years	4.5 (2.6; 6.6)
Current cART protocols	
Non-treated	33 (15.3%)
PI-based	45 (20.9%)
NNRTI-based	115 (53.5%)
NRTI-based	22 (10.2%)
HIV markers	
Nadir CD4+, T cells/μL	195 (84; 325)
CD4+, T cells/μL	472 (324; 682)
HIV-RNA < 50 copies/mL,	158 (73.5%)
HCV markers	
HCV genotype	
1	119 (56.1%)
2	5 (2.4%)
3	48 (22.6%)
4	40 (18.9%)
HCV RNA ≥ 500,000 IU/mL	159 (75.0%)
Liver biopsy	
Hepatic fibrosis	
F0	25 (11.6%)
F1	86 (40.0%)
F2	58 (27.0%)
F3	25 (11.6%)
F4	21 (9.8%)
Activity grade	
A ≤ 1	101 (47.0%)
A2	86 (40.8%)
A3	23 (10.9%)
A4	1 (0.5%)
Steatosis	114 (60.6%)
FIB-4	1.46 (1.03; 2.03)
FIB-4 ≥ 3.25	18 (8.9%)
APRI	0.75 (0.45; 1.30)
APRI ≥ 1.5	35 (17.2%)

Values are expressed as absolute numbers (%) and median (percentile 25; percentile 75).

Abbreviations: IVDU, intravenous drug user; HCV, hepatitis C virus; CDC, Centers for Disease Control and Prevention; BMI, body mass index; HOMA, homeostatic model assessment; cART, combined antiretroviral therapy; PI-based, protein inhibitor-based therapy; NNRTI-based, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor-based therapy; NRTI-based, nucleoside reverse transcriptase inhibitor-based therapy; HIV, human immunodeficiency virus; HIV-RNA, HIV plasma viral load; HCV-RNA, HCV plasma viral load; FIB-4, Fibrosis-4; APRI, aspartate aminotransferase to platelet ratio index.

respectively] (Fig. 3C). Regarding rs9376293 polymorphism, the significant outcomes were the same as those obtained by the unadjusted model. Patients with CT/CC genotypes had lower levels of APRI [aAMR = 0.77 (p = 0.018)] and decreased odds of having values of APRI ≥ 1.5 [aOR = 0.39 (p = 0.030)] (Fig. 3D), being the significance only remained for patients with HCV genotype 1/4 (Fig. 3E and Fig. 3F). Also, patients with rs6920220 AG/AA genotypes had higher odds of having FIB-4 ≥ 3.25 [aOR = 3.72 (p = 0.043)] (Fig. 3G). This

association was only remained for patients with HCV genotype 1/4 (Fig. 3H and Fig. 3I).

As long as the r^2 between polymorphisms is very low, we performed a haplotype analysis (comprised of rs675520, rs9376293 and rs6920220) in order to capture more genetic variability in the region. (Supplemental Table 1). The ATA haplotype carriers had higher odds of having FIB-4 ≥ 3.25 (aOR = 2.80; p = 0.021). The remaining haplotypes did not show any significant association.

3.3. Genetic variants upstream of TNFAIP3 and inflammation-related plasma biomarkers

In using unadjusted regression models (Table 3), patients with rs675520 AG/GG genotypes had lower levels of leptin and NGF (p = 0.002 and p = 0.001, respectively) and higher levels of sFas, MIF, TIMP1 and MMP2 (p = 0.008, p = 0.004, p = 0.016 and p = 0.026, respectively), compared to AA carriers. Furthermore, patients with rs9376293 CT/CC genotypes had lower leptin levels (p = 0.018) and higher sFas, MIF, TIMP1 and MMP2 levels (p = 0.025, p = 0.016, p = 0.028 and p = 0.012, respectively) than patients with TT genotype. Patients with rs6920220 AG/AA genotypes only had lower MMP1 levels than rs6920220 GG genotype (p = 0.021).

When adjusted regression models were used (Table 3), the rs675520 AG/GG genotypes were associated with lower levels of leptin and NGF [aAMR = 0.44 (p = 0.002) and aAMR = 0.39 (p = 0.002); respectively], and higher levels of sFas, MIF, TIMP1 and MMP2 [aAMR = 1.55 (p = 0.004), aAMR = 1.53 (p = 0.007), aAMR = 1.45 (p = 0.020), and aAMR = 1.65 (p = 0.033); respectively]. The rs9376293 CT/CC genotypes were related to lower levels of leptin [aAMR = 0.56 (p = 0.026)] and higher levels of sFas, MIF, TIMP1 and MMP2 [aAMR = 1.37 (p = 0.029), aAMR = 1.36 (p = 0.040), aAMR = 1.40 (p = 0.022), and aAMR = 1.62 (p = 0.022); respectively]. The rs6920220 AG/GG genotypes were only associated with lower levels of MMP1 [aAMR = 0.79 (p = 0.006)].

4. Discussion

To our knowledge, this study is the first description of the association of genetic variants upstream of *TNFAIP3* with severity of CHC in HIV/HCV-coinfected patients. The major findings were: i) the rs675520 AG/GG genotypes and the rs9376293 CT/CC genotypes were associated with lower odds of severe liver disease, and a favorable profile of plasma biomarkers of inflammation and fibrosis; ii) the rs6920220 AG/AA (risk) genotypes were linked to advanced liver disease by using FIB-4 and APRI.

The polymorphisms analyzed in this study map to an intergenic region of 6q23, between the genes *OLIG3* and *TNFAIP3*. *OLIG3* appears to be involved in neuronal development, and therefore is not likely to be associated with immune-mediated diseases. By contrast, *TNFAIP3* is a negative regulator of NF-kappaB activation and a powerful suppressor of cytokine signaling (Song et al., 2016), preventing chronic liver inflammation (Catrysse et al., 2016) and liver fibrosis (Yang et al., 2012), and it may modulate the inflammatory response to HCV in the liver (Song et al., 2016; Fan et al., 2015; Ma et al., 2014). Additionally, *TNFAIP3* has a key role in HCV infection. For instance, *TNFAIP3* expression is induced by HCV core protein and contributes to viral persistence by protecting hepatocytes from cell death due to an anti-apoptotic effect (Nguyen et al., 2006). *TNFAIP3* might also promote the chronification of HCV infection by maintaining low-grade chronic inflammation, which could lead to the long-term development of liver fibrosis (Song et al., 2016; Fan et al., 2015). With regard to *TNFAIP3* polymorphisms, significant implications have been previously described in numerous inflammatory and autoimmune diseases (Coenen et al., 2009; Stuart et al., 2015; Wang et al., 2016; Zhang et al., 2016a; Zhang et al., 2016b). Our data suggest an important role of certain genetic variants upstream of *TNFAIP3* on the severity of liver disease,

Table 2

Allele and genotype frequencies and Hardy Weinberg Equilibrium (HWE) polymorphisms in the 6q23 region upstream of *TNFAIP3* in HIV/HCV coinfecting patients compared to healthy Iberian populations in Spain from 1000 genomes data (<http://browser.1000genomes.org/index.html>).

Our HIV/HCV group						IBS group (n = 107)				χ^2 test(a)		χ^2 test (b)
SNPs	Genotypes		Alleles		HWE	Genotypes		Alleles		HWE	p-value	p-value
rs675520	AA	27.7%	A	51.1%	0.547	AA	19.6%	A	44.9%	0.758	0.380	0.389
	AG	46.9%	G	48.9%		AG	50.5%	G	55.1%			
	GG	25.4%				GG	29.9%					
rs9376293	CC	16.3%	C	40.9%	0.813	CC	18.7%	C	46.7%	0.173	0.408	0.364
	CT	49.3%	T	59.1%		CT	56.1%	T	53.3%			
	TT	34.4%				TT	25.2%					
rs6920220	GG	67.4%	G	82.1%	0.948	GG	69.2%	G	83.2%	0.664	0.837	0.954
	AG	29.3%	A	17.9%		AG	28.0%	A	16.8%			
	AA	3.3%				AA	2.8%					

Statistical: P-values were calculated by Chi-squared test; (a), differences in allelic frequencies; (b), differences in genotypic frequencies.

Abbreviations: HWE, Hardy Weinberg Equilibrium; HIV, human immunodeficiency virus; HCV, hepatitis C virus; IBS, Iberian populations in Spain.

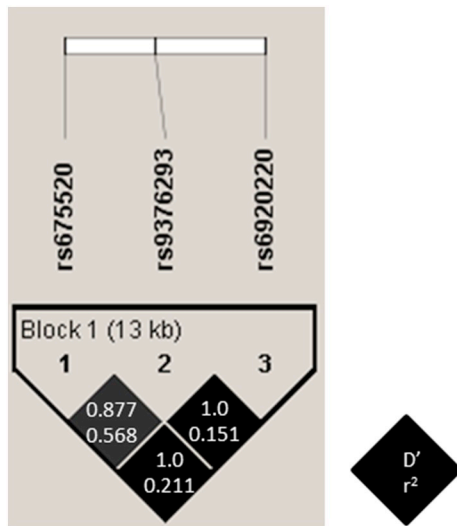


Fig. 1. Linkage disequilibrium among polymorphisms in the 6q23 region upstream of *TNFAIP3*. Each square represents a pairwise comparison between two SNPs.

found by using different markers of fibrosis (Metavir score from liver biopsy and qualitative and quantitative non-invasive markers), which provides robustness to our findings. Besides, *TNFAIP3* polymorphisms were associated with liver fibrosis independently of other relevant polymorphisms such as *IL28B* rs12980275 and *PNPLA3* rs738409 polymorphisms.

In order to investigate the possible mechanisms by which these genetic variants upstream of *TNFAIP3* are involved in the development of advanced fibrosis, we performed an *in-silico* analysis. By using rVarBase (Guo et al., 2016), we found that the polymorphism rs675520 is located in a genomic region that overlaps with the location of two long non-coding RNAs (lncRNAs), *lnc-TNFAIP3-3* and *lnc-OLIG3-1*. lncRNAs are large RNA transcripts that do not encode for proteins and have been implicated in a wide range of processes and diseases (Kung et al., 2013) by targeting different components of the transcription process. By using lncRNASNP software (Gong et al., 2015), we found that rs675520 implies a change in the structure of *lnc-OLIG3-1* and causes an increase in interaction between *lnc-OLIG3-1* and the microRNA hsa-miR-4645-3p. Thus, it is plausible that changes in gene expression of not only *TNFAIP3* but also *OLIG3* could be implicated in the susceptibility to inflammatory and immune diseases as well as in the severity of liver disease. Changes in *TNFAIP3* expression have been associated with rs6920220 polymorphism (Ungerback et al., 2012; Elsby et al., 2010). Additionally, rs9376293 and rs6920220 seem to have influence on the chromatin state of the region surrounding the

variant, based on experimental information from the Roadmap epigenomics project, as it was annotated in rVarBase. Chromatin state is a crucial contributor to all genomic processes, controlling and defining gene expression profiles and contributing to disease (Li et al., 2012). All these data could explain the association observed between genetic variants upstream of *TNFAIP3* and liver fibrosis in our study. However, it is also necessary to consider that the three SNPs are in strong LD with other regulatory SNPs, which could be the causal variant implicated in the association to liver fibrosis.

Haplotypes (formed by rs675520, rs9376293 and rs6920220) were also investigated to analyze the association with advanced fibrosis. We found that only ATA haplotype was associated with advanced fibrosis, specifically FIB-4 ≥ 3.25 . This indicates that haplotypes do not improve the prediction of advanced fibrosis compared to individual SNPs.

Moreover, our study for the first time describes an association between genetic variants upstream of *TNFAIP3* and several inflammation-related biomarkers in plasma. On the one hand, rs675520 AG/GG and rs9376293 CT/CC genotypes were linked to lower levels of leptin, and rs675520 AG/GG genotypes were also associated with lower levels of NGF. Leptin is an adipokine that mediates hepatic stellate cell (HSC) activation and liver fibrosis through indirect effects on Kupffer cells, partially mediated by TGF- β 1 (Sacchi et al., 2015). NGF is a neurotrophic factor synthesized by immune cells (Lambiase et al., 1997), which has also been involved in inflammatory and fibrotic disorders (Bonini et al., 1999). The decreased levels of these profibrogenic and proinflammatory molecules in rs675520 AG/GG and rs9376293 CT/CC genotypes are consistent with the protective effect of genetic variants upstream of *TNFAIP3* on the severity of liver disease. On the other hand, rs675520 AG/GG and rs9376293 CT/CC genotypes were associated with higher levels of sFas, MIF, TIMP1 and MMP2; and rs6920220 AA genotype with higher values of MMP1. Firstly, the Fas molecule is a member of the TNF superfamily characterized by initiating apoptosis in Fas-bearing cells and inducing the release of proinflammatory cytokines, enhancing the immune response and self-tissue damage (Caulfield and Lathem, 2014). However, sFas is generated by alternative splicing and may block Fas-signaling (Hughes and Crispe, 1995), leading to apoptosis resistance (Liu et al., 2002), and consequently, it could ameliorate innate host defense and inflammation. MIF is a pleiotropic inflammatory cytokine that has been implicated in various inflammatory diseases (Morrison and Kleemann, 2015). However, an antifibrotic effect of MIF has also been described through the use of C57BL/6 *Mif*^{-/-} mice (Heinrichs et al., 2011), which showed strong induced liver fibrosis in the absence of MIF. This finding supports our observation that genotypes related to higher MIF levels were associated with lower odds of advanced liver disease.

Regarding the increased levels of TIMP1, MMP1, and MMP2 observed in patients carrying the protective genotypes, it could be explained by the existence of dynamic changes in TIMP1, MMP1, and

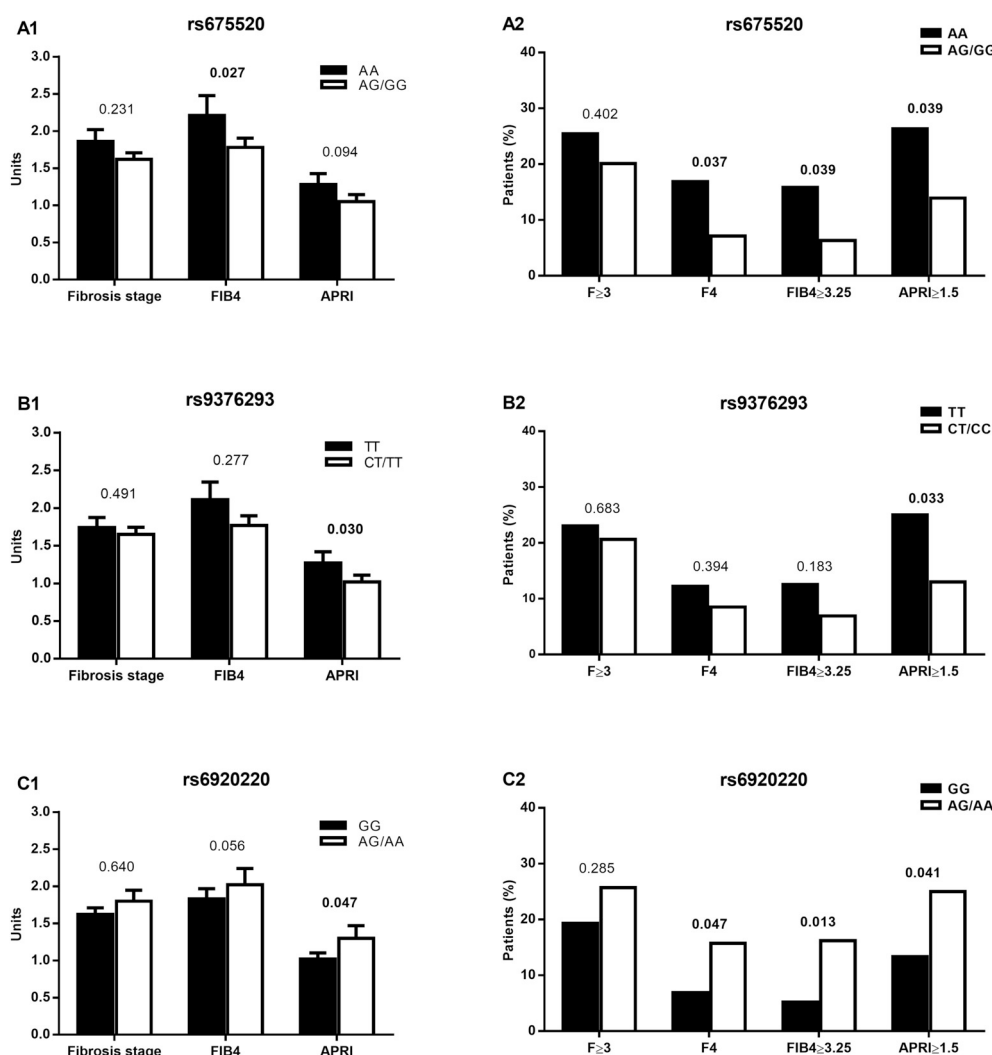


Fig. 2. Unadjusted association between polymorphisms in the 6q23 region upstream of *TNFAIP3* and liver disease severity in HIV/HCV-coinfected patients.

Statistical: Data are expressed as estimated marginal means from unadjusted generalized linear model for quantitative variables and percentages for dichotomous variables. P-values were calculated by unadjusted generalized linear model. Statistically significant differences are shown in bold.

Abbreviations: FIB-4, Fibrosis 4 index; APRI, aspartate aminotransferase to platelet ratio index.

MMP2 levels during liver fibrosis. These molecules are involved in extracellular matrix (ECM) remodeling (Mormone et al., 2011). Serum MMP1 is decreased in patients with advanced fibrosis stage (Trocme et al., 2006) and necroinflammation (Murawaki et al., 1999; Leroy et al., 2004), and increases after liver fibrosis improvement (Trocme et al., 2006; Murawaki et al., 1999). Conversely, MMP2 is activated in fibrotic liver and remains elevated during fibrotic progression (Trocme et al., 2006; Leroy et al., 2004; Latronico et al., 2016; Huang et al., 2015), but has also been related to accelerated matrix degradation during fibrosis resolution (Kantari-Mimoun et al., 2017). In fact, the treatment of HSCs with potential antifibrotic agents has resulted in increased MMP2 levels (Sakaida et al., 2004). On the other hand, TIMP1 blocks MMP activity (Mormone et al., 2011) and plays an important role in promoting liver fibrosis (Mormone et al., 2011; Parsons et al., 2004). The plasma level of TIMP1 is also elevated in CHC patients with advanced fibrosis stage (Latronico et al., 2016; Resino et al., 2010). However, TIMP1 has also been reported as a protector molecule against acute and chronic liver injury and liver fibrosis induced by hepatotoxic agents (Wang et al., 2011). Thus, plasma levels of TIMP1 and MMP2 could reflect the fibrotic process in the liver in such a way

that the increase of TIMP1 (pro-fibrotic) levels would be compatible with the increase of MMP2 (anti-fibrotic) to compensate its effects.

Finally, several aspects must be considered for the correct interpretation of our results. Firstly, this report has a cross-sectional design with a limited number of patients, which could limit the finding of significant values in some groups. Secondly, all selected patients met a set of criteria for starting HCV treatment (e.g., no alcohol abuse, high CD4 cell counts, controlled HIV replication, and good treatment adherence), and this may have introduced a selection bias. Thirdly, this study was performed on patients with European descent, and it would also be required to carry out these analyses on different ethnic groups. Finally, our study only included HIV/HCV-coinfected patients and it would be interesting to know the role of the studied polymorphisms in HCV mono-infected patients, but we did not have access to a cohort of HCV mono-infected patients with biopsy data.

5. Conclusions

In conclusion, the rs675520, rs9376293 and rs6920220 polymorphisms upstream of *TNFAIP3* were associated with the severity of liver fibrosis, suggesting that these polymorphisms might play a

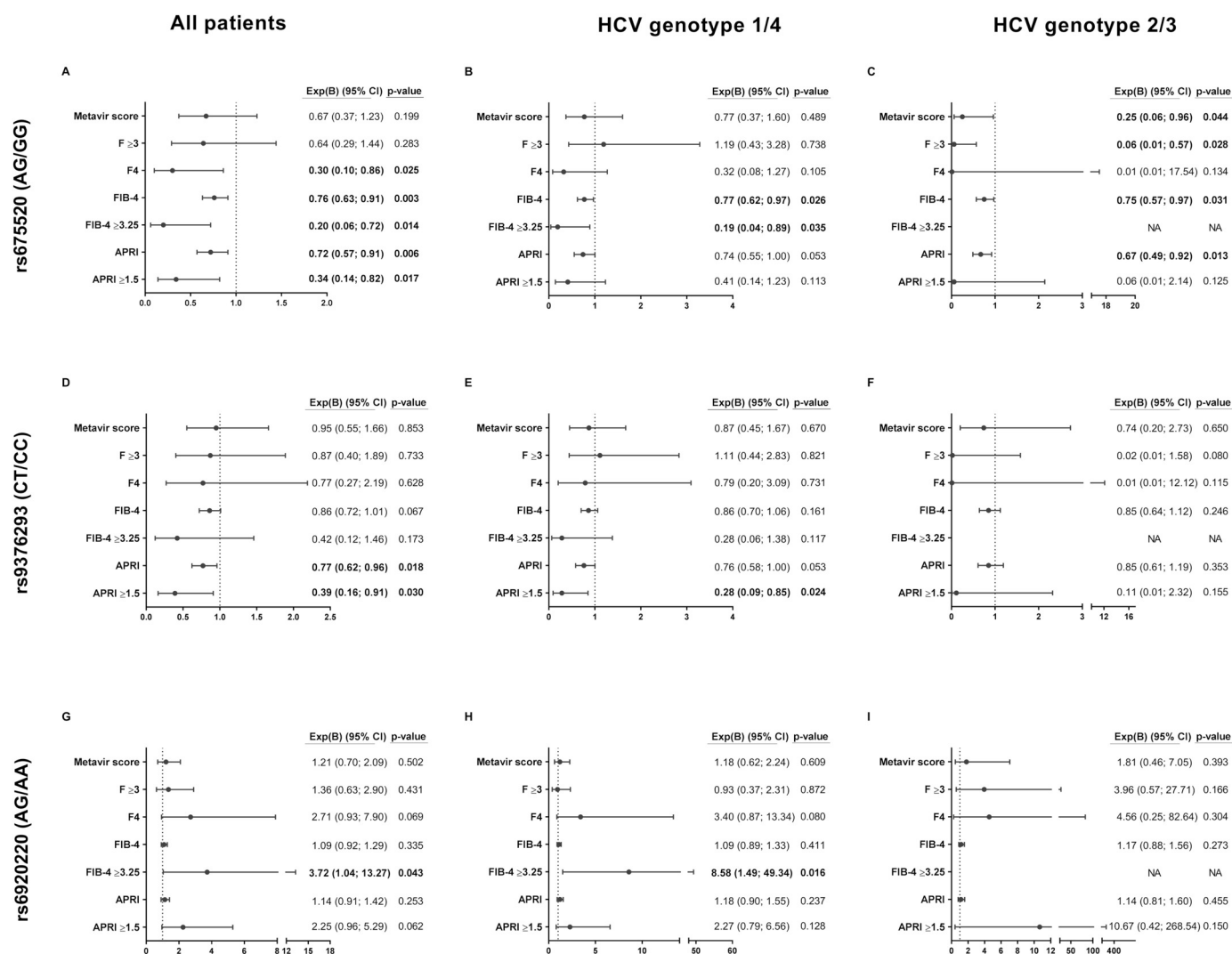


Fig. 3. Association between polymorphisms in the 6q23 region upstream of *TNFAIP3* and liver disease severity in HIV/HCV-coinfected patients, for all patients and after stratifying by HCV genotype.

Statistical: P-values were calculated by generalized linear model adjusted by the most important clinical and epidemiological characteristics (see **statistical analysis** section). Statistically significant differences are shown in bold.

Abbreviations: HIV, human immunodeficiency virus; HCV, hepatitis C virus; Exp(B) is arithmetic mean ratio (AMR) for continuous variables or odds ratio (OR) for categorical variables; 95%CI, 95% of confidence interval; p-value, level of significance; HCV-GT, HCV genotype; F ≥ 3, advance fibrosis; F4, cirrhosis; FIB-4, Fibrosis 4 index; APRI, aspartate aminotransferase to platelet ratio index; NA, not available results by small sample size in some comparison group.

significant role in CHC progression, as well as decisions for the optimal management of infected patients with HIV and HCV. Further analyses are needed to corroborate these conclusions.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.10.008>.

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and materials

The datasets used and analyzed during the current study may be made available by the corresponding author upon reasonable request.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding information

This work has been supported by grants given by Fondo de Investigación de Sanidad en España (FIS) [Spanish Health Funds for Research] [grant numbers PI14/01094 and PI17/00657 to JB, PI14CIII/00011 and PI17CIII/00003 to SR] and Red Española de Investigación en SIDA (RIS) [AIDS Research Network] [grant numbers RD16CIII/0002/0002RD16 and RD16/0025/0017].

JB is an investigator from the “Programa de Intensificación de la Actividad Investigadora en el Sistema Nacional de Salud (I3SNS)”. MAJS, AFR, and LMM are supported by “Instituto de Salud Carlos III” [grant numbers CD13/00013, CP14CIII/00010 and CD14/00002, respectively].

Table 3Relationship between polymorphisms in the 6q23 region upstream of *TNFAIP3* and liver disease severity in HIV/HCV coinfecting patients according to HCV genotype.

A) rs675520 (AG/GG)	Unadjusted			Adjusted	
	AA	AG/GG	p-value ^(a)	aAMR (95% CI)	p-value ^(b)
Leptin (pg/ml)	13,457.03	6263.34	0.002	0.44 (0.26; 0.75)	0.002
NGF (pg/ml)	28.43	11.73	0.001	0.39 (0.21; 0.71)	0.002
sFas (pg/ml)	8817.86	13,327.13	0.008	1.55 (1.15; 2.09)	0.004
MIF (pg/ml)	1538.40	2416.44	0.004	1.53 (1.12; 2.08)	0.007
TIMP1 (pg/ml)	213.37	310.00	0.016	1.45 (1.06; 1.98)	0.020
MMP1 (pg/ml)	204.92	211.13	0.751	1.02 (0.84; 1.22)	0.869
MMP2 (pg/ml)	197.30	321.50	0.026	1.65 (1.04; 2.61)	0.033
B) rs9376293 (CT/CC)	TT	CT/CC	p-value^(a)	aAMR (95% CI)	p-value^(b)
Leptin (pg/ml)	12,057.91	6823.02	0.018	0.56 (0.34; 0.93)	0.026
NGF (pg/ml)	19.50	14.32	0.240	0.91 (0.54; 1.74)	0.914
sFas (pg/ml)	9636.61	13,324.15	0.025	1.37 (1.03; 1.81)	0.029
MIF (pg/ml)	1706.74	2419.89	0.016	1.36 (1.01; 1.82)	0.040
TIMP1 (pg/ml)	225.24	309.94	0.028	1.40 (1.05; 1.87)	0.022
MMP1 (pg/ml)	190.13	217.07	0.123	1.11 (0.93; 1.31)	0.241
MMP2 (pg/ml)	203.93	337.86	0.012	1.62 (1.07; 2.45)	0.022
C) rs6920220 (AG/AA)	GG	AG/AA	p-value^(a)	aAMR (95% CI)	p-value^(b)
Leptin (pg/ml)	8029.07	9694.80	0.444	1.15 (0.71; 1.87)	0.565
NGF (pg/ml)	18.44	11.04	0.052	0.63 (0.37; 1.08)	0.095
sFas (pg/ml)	12,754.30	10,716.38	0.238	0.81 (0.61; 1.07)	0.140
MIF (pg/ml)	2308.04	1919.00	0.214	0.83 (0.62; 1.10)	0.195
TIMP1 (pg/ml)	281.98	281.16	0.984	0.92 (0.68; 1.24)	0.577
MMP1 (pg/ml)	220.60	180.83	0.021	0.79 (0.67; 0.94)	0.006
MMP2 (pg/ml)	308.31	259.29	0.406	0.83 (0.55; 1.26)	0.375

Data are expressed as estimated marginal means from unadjusted generalized linear model.

Statistical: (a), p-values were calculated by univariate generalized linear model; (b), p-values were calculated by multivariate generalized linear model adjusted by the most important clinical and epidemiological characteristics (see **statistical analysis** section). Statistically significant differences are shown in bold.**Abbreviations:** HIV, human immunodeficiency virus; HCV, hepatitis C virus; aAMR, adjusted arithmetic mean ratio; 95%CI, 95% of confidence interval; p-value, level of significance; NGF, nerve growth factor; sFas, soluble Fas cell surface death receptor; MIF, macrophage migration inhibitory factor; TIMP1, TIMP metalloproteinase inhibitor 1; MMP1, matrix metalloproteinase 1; MMP2, matrix metalloproteinase 2.

Acknowledgements

The authors thank the Spanish National Genotyping Center (CEGEN-PRB2-ISCI) for providing SNP genotyping services (<http://www.cegen.org>); it is supported by grant PT13/0001, ISCI-SGEFI/FEDER.

Author contributions

Conceptualization: MAJS, IMG, and SR.
 Resources and data curation: MAJS, AFR, LMM, LV, MMV, MGR, JB, TAE, CD, and LPT.
 Investigation: MAJS, IMG, JB, and SR.
 Formal analysis: MAJS and SR.
 Writing – original draft preparation: MAJS, IMG, and SR.
 Writing – Review & Editing: JB, AFR, and LMM.
 Visualization, supervision and funding acquisition: SR.

References

Arguello, M., Paz, S., Ferran, C., Moll, H.P., Hiscott, J., 2014. Anti-viral tetris: modulation of the innate anti-viral immune response by a20. *Adv. Exp. Med. Biol.* 809, 49–64.

Auton, A., Brooks, L.D., Durbin, R.M., Garrison, E.P., Kang, H.M., Korbel, J.O., Marchini, J.L., McCarthy, S., McVean, G.A., Abecasis, G.R., et al., 2015. A global reference for human genetic variation. *Nature* 526, 68–74.

Bonini, S., Lambiase, A., Levi-Schaffer, F., Aloe, L., 1999. Nerve growth factor: an important molecule in allergic inflammation and tissue remodelling. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 118, 159–162.

Breckpot, K., Aerts-Toegaert, C., Heirman, C., Peeters, U., Beyaert, R., Aerts, J.L., Thielemans, K., 2009. Attenuated expression of a20 markedly increases the efficacy of double-stranded rna-activated dendritic cells as an anti-cancer vaccine. *J. Immunol.* 182, 860–870.

Catrysse, L., Farhang Ghahremani, M., Vereecke, L., Youssef, S.A., Mc Guire, C., Sze, M., Weber, A., Heikenwalder, M., de Bruin, A., Beyaert, R., et al., 2016. A20 prevents chronic liver inflammation and cancer by protecting hepatocytes from death. *Cell Death Dis.* 7, e2250.

Caulfield, A.J., Latham, W.W., 2014. Disruption of fas-fas ligand signaling, apoptosis, and innate immunity by bacterial pathogens. *PLoS Pathog.* 10, e1004252.

Coenen, M.J., Trynka, G., Heskamp, S., Franke, B., van Diemen, C.C., Smolonska, J., van

Leeuwen, M., Brouwer, E., Boezen, M.H., Postma, D.S., et al., 2009. Common and different genetic background for rheumatoid arthritis and coeliac disease. *Hum. Mol. Genet.* 18, 4195–4203.

da Silva, C.G., Cervantes, J.R., Studer, P., Ferran, C., 2014. A20—an omnipotent protein in the liver: prometheus myth resolved? *Adv. Exp. Med. Biol.* 809, 117–139.

Elsby, L.M., Orozco, G., Denton, J., Worthington, J., Ray, D.W., Donn, R.P., 2010. Functional evaluation of tnfaip3 (a20) in rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 28, 708–714.

Fan, C., Zhang, Y., Zhou, Y., Li, B., He, Y., Guo, Y., Jia, Z., 2015. Up-regulation of a20/abin1 contributes to inefficient m1 macrophage polarization during hepatitis c virus infection. *Virology* 12, 147.

Friedman, S.L., 2010. Evolving challenges in hepatic fibrosis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 7, 425–436.

Ghany, M.G., Strader, D.B., Thomas, D.L., Seeff, L.B., 2009. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis c: an update. *Hepatology* 49, 1335–1374.

Gong, J., Liu, W., Zhang, J., Miao, X., Guo, A.Y., 2015. Lncrnasnp: a database of snps in lncrnas and their potential functions in human and mouse. *Nucleic Acids Res.* 43, D181–D186.

Guo, L., Du, Y., Qu, S., Wang, J., Rvarbase, 2016. An updated database for regulatory features of human variants. *Nucleic Acids Res.* 44, D888–D893.

Heim, M.H., Thimme, R., 2014. Innate and adaptive immune responses in hcv infections. *J. Hepatol.* 61, S14–S25.

Heinrichs, D., Knaul, M., Offermanns, C., Berres, M.L., Nellen, A., Leng, L., Schmitz, P., Bucala, R., Trautwein, C., Weber, C., et al., 2011. Macrophage migration inhibitory factor (mif) exerts antifibrotic effects in experimental liver fibrosis via cd74. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 17444–17449.

Huang, C.Y., Tseng, K.C., Lin, M.N., Tsai, J.P., Su, C.C., 2015. Plasma levels of matrix metalloproteinase-2 and -9 in male and female patients with cirrhosis of different aetiologies. *J. Clin. Pathol.* 68, 917–922.

Hughes, D.P., Crispe, I.N., 1995. A naturally occurring soluble isoform of murine fas generated by alternative splicing. *J. Exp. Med.* 182, 1395–1401.

Kantari-Mimoun, C., Krzywinska, E., Castells, M., Milien, C., Klose, R., Meinecke, A.K., Lemberger, U., Mathivet, T., Gokjovic, M., Schroder, K., et al., 2017. Boosting the hypoxic response in myeloid cells accelerates resolution of fibrosis and regeneration of the liver in mice. *Oncotarget* 8, 15085–15100.

Kung, J.T., Colognori, D., Lee, J.T., 2013. Long noncoding rnas: past, present, and future. *Genetics* 193, 651–669.

Lambiase, A., Bracci-Laudiero, L., Bonini, S., Starace, G., D'Elios, M.M., De Carli, M., Aloe, L., 1997. Human cd4+ t cell clones produce and release nerve growth factor and express high-affinity nerve growth factor receptors. *J. Allergy Clin. Immunol.* 100, 408–414.

Latronico, T., Mascia, C., Pati, I., Zuccala, P., Mengoni, F., Marocco, R., Tieghi, T., Belvisi, V., Lichtner, M., Vullo, V., et al., 2016. Liver fibrosis in hcv monoinfected and hiv/hcv coinfecting patients: dysregulation of matrix metalloproteinases (mmps) and their

- tissue inhibitors timp1 and effect of hcv protease inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 455.
- Leroy, V., Monier, F., Bottari, S., Trocme, C., Sturm, N., Hilleret, M.N., Morel, F., Zarski, J.P., 2004. Circulating matrix metalloproteinases 1, 2, 9 and their inhibitors timp-1 and timp-2 as serum markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis c: comparison with piipn and hyaluronic acid. *Am. J. Gastroenterol.* 99, 271–279.
- Li, R., Guo, W., Gu, J., Zhang, M.Q., Wang, X., 2012. Chromatin state and microrna determine different gene expression dynamics responsive to tnf stimulation. *Genomics* 100, 297–302.
- Liu, J.H., Wei, S., Lamy, T., Li, Y., Epling-Burnette, P.K., Djeu, J.Y., Loughran Jr., T.P., 2002. Blockade of fas-dependent apoptosis by soluble fas in lgl leukemia. *Blood* 100, 1449–1453.
- Liu, Z., Li, H., Hu, X., Yu, L., Liu, H., Han, R., Colella, R., Mower, G.D., Chen, Y., Qiu, M., 2008. Control of precerebellar neuron development by olig3 bhlh transcription factor. *J. Neurosci.* 28, 10124–10133.
- Lopez-Dieguez, M., Montes, M.L., Pascual-Pareja, J.F., Quereda, C., Von Wichmann, M.A., Berenguer, J., Tural, C., Hernando, A., Gonzalez-Garcia, J., Serrano, L., et al., 2011. The natural history of liver cirrhosis in hiv-hepatitis c virus-coinfected patients. *AIDS* 25, 899–904.
- Ma, L., Zhou, Y., Zhang, Y., Li, Y., Guo, Y., He, Y., Wang, J., Lian, J., Hao, C., Moorman, J.P., et al., 2014. Role of a20 in interferon-alpha-mediated functional restoration of myeloid dendritic cells in patients with chronic hepatitis c. *Immunology* 143, 670–678.
- Macias, J., Berenguer, J., Japon, M.A., Giron, J.A., Rivero, A., Lopez-Cortes, L.F., Moreno, A., Gonzalez-Serrano, M., Iribarren, J.A., Ortega, E., et al., 2009. Fast fibrosis progression between repeated liver biopsies in patients coinfected with human immunodeficiency virus/hepatitis c virus. *Hepatology* 50, 1056–1063.
- Mele, A., Cervantes, J.R., Chien, V., Friedman, D., Ferran, C., 2014. Single nucleotide polymorphisms at the tnfaip3/a20 locus and susceptibility/resistance to inflammatory and autoimmune diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* 809, 163–183.
- Mengshol, J.A., Golden-Mason, L., Rosen, H.R., 2007. Mechanisms of disease: Hcv-induced liver injury. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* 4, 622–634.
- Mormone, E., George, J., Nieto, N., 2011. Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches. *Chem. Biol. Interact.* 193, 225–231.
- Morrison, M.C., Kleemann, R., 2015. Role of macrophage migration inhibitory factor in obesity, insulin resistance, type 2 diabetes, and associated hepatic co-morbidities: a comprehensive review of human and rodent studies. *Front. Immunol.* 6, 308.
- Murawaki, Y., Ikuta, Y., Idobe, Y., Kawasaki, H., 1999. Serum matrix metalloproteinase-1 in patients with chronic viral hepatitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 14, 138–145.
- Nguyen, H., Sankaran, S., Dandekar, S., 2006. Hepatitis c virus core protein induces expression of genes regulating immune evasion and anti-apoptosis in hepatocytes. *Virology* 354, 58–68.
- Ortiz, V., Berenguer, M., Rayon, J.M., Carrasco, D., Berenguer, J., 2002. Contribution of obesity to hepatitis c-related fibrosis progression. *Am. J. Gastroenterol.* 97, 2408–2414.
- Panel de expertos de Gesida Plan Nacional sobre el Sida y Asociación Española para el Estudio del Hígado, 2010. recommendations of gesida/pns/aeeh for the management and treatment of the adult patient co-infected with hiv and hepatitis a, b and c virus. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* 28 31 e31–31.
- Parsons, C.J., Bradford, B.U., Pan, C.Q., Cheung, E., Schauer, M., Knorr, A., Krebs, B., Kraft, S., Zahn, S., Brocks, B., et al., 2004. Antifibrotic effects of a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 antibody on established liver fibrosis in rats. *Hepatology* 40, 1106–1115.
- Resino, S., Micheloud, D., Miralles, P., Bellon, J.M., Vargas, A., Catalan, P., Alvarez, E., Cosin, J., Lorente, R., Lopez, J.C., et al., 2010. Diagnosis of advanced fibrosis in hiv and hepatitis c virus-coinfected patients via a new noninvasive index: the hgm-3 index. *HIV Med.* 11, 64–73.
- Resino, S., Seoane, J.A., Bellon, J.M., Dorado, J., Martin-Sanchez, F., Alvarez, E., Cosin, J., Lopez, J.C., Lopez, G., Miralles, P., et al., 2011. An artificial neural network improves the non-invasive diagnosis of significant fibrosis in hiv/hcv coinfected patients. *J. Inf. Secur.* 62, 77–86.
- Resino, S., Sanchez-Conde, M., Berenguer, J., 2012. Coinfection by human immunodeficiency virus and hepatitis c virus: noninvasive assessment and staging of fibrosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 25, 564–569.
- Rotman, Y., Liang, T.J., 2009. Coinfection with hepatitis c virus and human immunodeficiency virus: virological, immunological, and clinical outcomes. *J. Virol.* 83, 7366–7374.
- Rueger, S., Bochud, P.Y., Dufour, J.F., Mullhaupt, B., Semela, D., Heim, M.H., Moradpour, D., Cerny, A., Malinverni, R., Booth, D.R., et al., 2015. Impact of common risk factors of fibrosis progression in chronic hepatitis c. *Gut* 64, 1605–1615.
- Sacchi, P., Cima, S., Zuccaro, V., Columpsi, P., Sarda, C., Mariani, M., Puoti, M., Bruno, R., 2015. Understanding the mechanisms of fibrogenesis in hiv/hcv-coinfected patients: implications for clinical practice. *AIDS Rev.* 17, 159–170.
- Sakaida, I., Hironaka, K., Kimura, T., Terai, S., Yamasaki, T., Okita, K., 2004. Herbal medicine sho-saiko-to (tj-9) increases expression matrix metalloproteinases (mmps) with reduced expression of tissue inhibitor of metalloproteinases (timp1) in rat stellate cell. *Life Sci.* 74, 2251–2263.
- Song, X.T., Evel-Kabler, K., Shen, L., Rollins, L., Huang, X.F., Chen, S.Y., 2008. A20 is an antigen presentation attenuator, and its inhibition overcomes regulatory t cell-mediated suppression. *Nat. Med.* 14, 258–265.
- Song, X., Yao, Z., Yang, J., Zhang, Z., Deng, Y., Li, M., Ma, C., Yang, L., Gao, X., Li, W., et al., 2016. Hcv core protein binds to gc1qr to induce a20 expression and inhibit cytokine production through mapks and nf-kappab signaling pathways. *Oncotarget* 7, 33796–33808.
- Stuart, P.E., Nair, R.P., Tsoi, L.C., Tejasvi, T., Das, S., Kang, H.M., Ellinghaus, E., Chandran, V., Callis-Duffin, K., Ike, R., et al., 2015. Genome-wide association analysis of psoriatic arthritis and cutaneous psoriasis reveals differences in their genetic architecture. *Am. J. Hum. Genet.* 97, 816–836.
- Trocme, C., Leroy, V., Sturm, N., Hilleret, M.N., Bottari, S., Morel, F., Zarski, J.P., 2006. Longitudinal evaluation of a fibrosis index combining mmp-1 and piipn compared with mmp-9, timp-1 and hyaluronic acid in patients with chronic hepatitis c treated by interferon-alpha and ribavirin. *J. Viral Hepat.* 13, 643–651.
- Ungerback, J., Belenki, D., Jawad Ul-Hassan, A., Fredrikson, M., Fransen, K., Elander, N., Verma, D., Soderkvist, P., 2012. Genetic variation and alterations of genes involved in nf-kappab/tnfaip3- and nlrp3-inflammasome signaling affect susceptibility and outcome of colorectal cancer. *Carcinogenesis* 33, 2126–2134.
- Wang, H., Lafdil, F., Wang, L., Yin, S., Feng, D., Gao, B., 2011. Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (timp-1) deficiency exacerbates carbon tetrachloride-induced liver injury and fibrosis in mice: involvement of hepatocyte stat3 in timp-1 production. *Cell Biosci.* 1, 14.
- Wang, M.J., Yang, H.Y., Zhang, H., Zhou, X., Liu, R.P., Mi, Y.Y., 2016. Tnfaip3 gene rs10499194, rs13207033 polymorphisms decrease the risk of rheumatoid arthritis. *Oncotarget* 7, 82933–82942.
- Yang, J., Xu, M.Q., Yan, L.N., Chen, X.B., Liu, J., 2012. Zinc finger protein a20 protects rats against chronic liver allograft dysfunction. *World J. Gastroenterol.* 18, 3537–3550.
- Zhang, M., Peng, L.L., Wang, Y., Wang, J.S., Liu, J., Liu, M.M., Hu, J., Song, B., Yang, H.B., 2016a. Roles of a20 in autoimmune diseases. *Immunol. Res.* 64, 337–344.
- Zhang, M.Y., Yang, X.K., Pan, H.F., Ye, D.Q., 2016b. Associations between tnfaip3 gene polymorphisms and systemic lupus erythematosus risk: an updated meta-analysis. *HLA* 88, 245–252.
- Zhu, L., Wang, L., Wang, X., Zhou, L., Liao, Z., Xu, L., Wu, H., Ren, J., Li, Z., Yang, L., et al., 2015. Characteristics of a20 gene polymorphisms and clinical significance in patients with rheumatoid arthritis. *J. Transl. Med.* 13, 215.

Article

siRNA-Mediated Simultaneous Regulation of the Cellular Innate Immune Response and Human Respiratory Syncytial Virus Replication

María Martín-Vicente, Salvador Resino *  and Isidoro Martínez * 

Unidad de Infección Viral e Inmunidad, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, 28220 Madrid, Spain; maria.martinv@externos.isciii.es

* Correspondence: sresino@isciii.es (S.R.); imago@isciii.es (I.M.); Tel.: +34-91-8223266 (S.R.); +34-91-8223272 (I.M.); Fax: +34-91-5097919 (S.R. & I.M.)

Received: 9 April 2019; Accepted: 23 April 2019; Published: 28 April 2019



Abstract: Human respiratory syncytial virus (HRSV) infection is a common cause of severe lower respiratory tract diseases such as bronchiolitis and pneumonia. Both virus replication and the associated inflammatory immune response are believed to be behind these pathologies. So far, no vaccine or effective treatment is available for this viral infection. With the aim of finding new strategies to counteract HRSV replication and modulate the immune response, specific small interfering RNAs (siRNAs) were generated targeting the mRNA coding for the viral fusion (F) protein or nucleoprotein (N), or for two proteins involved in intracellular immune signaling, which are named tripartite motif-containing protein 25 (TRIM25) and retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I). Furthermore, two additional bispecific siRNAs were designed that silenced F and TRIM25 (TRIM25/HRSV-F) or N and RIG-I (RIG-I/HRSV-N) simultaneously. All siRNAs targeting N or F, but not those silencing TRIM25 or RIG-I alone, significantly reduced viral titers. However, while siRNAs targeting F inhibited only the expression of the F mRNA and protein, the siRNAs targeting N led to a general inhibition of viral mRNA and protein expression. The N-targeting siRNAs also induced a drastic decrease in the expression of genes of the innate immune response. These results show that both virus replication and the early innate immune response can be regulated by targeting distinct viral products with siRNAs, which may be related to the different role of each protein in the life cycle of the virus.

Keywords: respiratory syncytial virus; siRNA; innate immune response; treatment

1. Introduction

Human respiratory syncytial virus (HRSV) is an enveloped, single-stranded, negative-sense RNA virus belonging to the *Orthopneumovirus* genus within the *Pneumoviridae* family, whose genome contains 10 genes encoding 11 proteins [1,2]. Three of them (F, G, and SH) are glycoproteins inserted in the viral envelope. F and G are involved in virus attachment and entry into target cells, while the role of SH is less clear. Five proteins (N, P, L, M2-1, and M2-2) are involved in viral RNA replication and transcription. An additional structural protein (M) forms a protein layer under the viral envelope and participates in virus maturation. Lastly, two non-structural proteins (NS1 and NS2) have been implicated in counteracting the host immune response to HRSV infection [3,4].

Human respiratory syncytial virus is a recognized important pathogen that causes serious low tract respiratory infections in infants, the elderly, and immunocompromised people [5,6], and it is also related to the exacerbation of asthma and chronic obstructive disease [7,8]. It is estimated that HRSV produces more than 33 million low respiratory infections in children under five years old each year. Approximately 10% of them require hospitalization and about 60,000 die, mostly in developing countries [9,10].

The immune response against HRSV begins in the infected respiratory epithelial cells, where viral RNA is recognized by pattern recognition receptors (PRRs), mainly retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)-like and Toll-like receptors, which leads to the induction of type I and III interferons, inflammatory cytokines, and antiviral genes [11]. The RIG-I is a cytosolic PRR that recognizes pathogen-specific uncapped RNAs, which trigger the induction of innate immune genes [12]. Retinoic acid-inducible gene-I, which is encoded by the *DExD/H-box helicase 58 (DDX58)* gene, is essential for the development of the early anti-HRSV response [13], and its activity is tightly regulated to ensure proper termination of immune signaling after virus clearance. This regulation is mainly mediated by processes of ubiquitination and deubiquitination in which the E3 ubiquitin ligase tripartite motif-containing protein 25 (TRIM25) has a prominent role [14]. The TRIM25-mediated activation of RIG-I is essential for the initiation of the intracellular antiviral response, although TRIM25 may also negatively regulate RIG-I through a different mechanism [15].

Despite its health impact, there is no available vaccine or effective treatment against this virus, although intensive efforts are being made in both fields [16,17]. In addition to this, the strong inflammation associated with serious HRSV infections of the lower respiratory tract does not respond to conventional anti-inflammatory treatments [18]. As a result of all these issues in preventing and treating HRSV infections, intensive research is being done looking for alternative approaches, such as the development of antivirals or treatment with immunomodulatory molecules aiming to moderate the viral-induced pathology.

Recently, synthetic small interfering RNAs (siRNAs) have emerged as promising molecules to treat several pathologies, including cancer, inflammatory disorders, and metabolic and infectious diseases [19,20]. Pioneering studies showing the efficacy of siRNAs against viruses included HRSV [21], human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) [22], and the influenza virus [23,24]. Afterward, several studies have reported the inhibition of HRSV by siRNA-mediated silencing of a number of HRSV genes, including *NS1*, *N*, *P*, *F*, and *M2-2* [25–34]. Some of them have been tested in vivo in the mouse model and found to restrict HRSV replication [25,27,32]. These siRNAs were administered intranasally and they were effective even when delivered free of transfection reagents and in prophylaxis or treatment models [25,27,32]. These results encouraged further investigations, and an siRNA (ALN-RSV01) targeting HRSV N was shown to significantly reduce the number of virus infections in healthy adults in a Phase 2 study [28]. The ALN-RSV01 was tested in lung transplant patients in a Phase 2 clinical trial [29,31]. However, although it decreased the rate of new or progressive bronchiolitis obliterans syndrome, there was no significant effect on viral parameters or symptom scores [31].

With the aim of identifying new molecules to treat HRSV infection, in the present study, we have designed two bispecific siRNAs that simultaneously target the HRSV F and TRIM25 mRNAs or the HRSV N and RIG-I mRNAs. The effect of these bispecific siRNAs was compared to monospecific siRNAs silencing F, N, TRIM25, or RIG-I alone. Both bispecific siRNAs and monospecific siRNAs targeting viral genes reduced virus growth and proinflammatory cytokine production. Notably, while siRNAs targeting N and F reduced virus growth to a similar extent, they differed markedly in the inhibition of viral RNA and protein accumulation as well as in the attenuation of the inflammatory/antiviral response.

2. Materials and Methods

2.1. Cells and Virus

Human lung carcinoma cells (A549) and human carcinoma HeLa-derived cells (HEp-2) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, HyClone, Logan, Utah, USA) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Biological Industries, Beit HaEmek, Israel), 4 mM L-Glutamine (HyClone), 100 U/mL penicillin (Lonza, Verviers, Belgium), and 100 µg/mL streptomycin (HyClone) (DMEM10). Cells were cultured at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. HEp-2 cells were infected with the HRSV Long strain and the virus was purified from clarified culture supernatants by polyethylene glycol precipitation and centrifugation in a discontinuous sucrose gradient, as previously

described [35,36]. The purified virus was aliquoted and stored in liquid nitrogen as a stock for subsequent infections.

2.2. Viral Infections and Plaque Assays

A549 were infected with HRSV at a multiplicity of infection (MOI) of 3 or 0.1 plaque-forming units (pfu) per cell in DMEM 2% FBS (DMEM2). Virus adsorption was allowed for 90 min at 37 °C. After this time, fresh DMEM2 was added. Culture supernatants and cell pellets were collected at different times post-infection. Virus titers were determined in the supernatants and total RNA and proteins were extracted from the cell pellets.

For HRSV titration, HEp-2 cell monolayers were incubated with serial dilutions of the infected cell supernatants for 90 min at 37 °C and then covered with 0.7% agarose (LM Sieve, Conda, Madrid, Spain) in DMEM2. Agarose was allowed to harden during 45 min at 4 °C, and then cells were transferred to a CO₂ incubator at 37 °C for five days. After this, cells were fixed with 4% formaldehyde in PBS for 45 min, which was followed by methanol permeabilization for 10 min. Virus plaques were visualized by one hour incubation with a mixture of monoclonal antibodies against HRSV [35], followed by one hour incubation with an anti-mouse IgG horseradish-peroxidase-linked whole antibody (Abcam, Cambridge, UK), and 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC, Alfa Aesar, Ward Hill, MA, USA).

2.3. Quantitative Real Time-PCR

Total RNA from treated or controlled cells was purified with the ReliaPrep RNA Cell Miniprep System (Promega, Madison, WI, USA) and was reverse transcribed with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Gene expression was quantitated in triplicate by RT-PCR (qRT-PCR) with a Step One instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) following the manufacturer's instructions.

TaqMan MGB probes (FAM dye-Labeled, Applied Biosystems) were used for the following cellular genes: *tripartite motif-containing 25 (TRIM25)* (Hs01116121_m1), *DExD/H-Box Helicase 58 (DDX58)* (RIG-I, Hs00204833_m1), *actin-β (ACTB)* (Hs99999903_m1), *interleukin 6 (IL6)* (Hs00985639_m1), *interferon-stimulated gene 15 (ISG15)* (Hs00192713_m1), *interferon-β1 (IFNB1)* (Hs01077958_s1), *tumor necrosis factor (TNF)* (Hs00174128_m1), and *chemokine C-C motif ligand 5 (CCL5)* (Hs00982282_m1). Gene expression was normalized to *ACTB* expression and relative quantifications were made by the comparative CT ($\Delta\Delta C_T$) method.

Expression of HRSV genes was performed, according to the manufacturer's instructions, using a SYBR-Green reaction mix (Power-Up SYBR-Green Master MIX, Applied Biosystems) and the following primers: *N* (forward: 5'-CATGATTCTCCTGATTGTGGGATGA-3', reverse: 5'-TCACGGCTGTAAGACCAGATCTAT-3'); *F* (forward: 5'-ACCAGCAAAGTGTAGACCTCAA-3', reverse: 5'-TCCCTGGTAATCTCTAGTAGTCTG-3'); *NS1* (forward: 5'-GCTTTGGCTAAGGCAGT GAT-3', reverse: 5'-CCATTAGGTTGAGAGCAATGTG-3'); *L* (forward: 5'-TGGCAGTTACAGAGGTTTTTG-3', reverse: 5'-GCCCCGTGAGGATATGTAGGTT-3'); *G* (forward: 5'-CCTCAGCTTGGAATCAGCTT-3', reverse: 5'-GTGTTTGTGTTTGGCGTTGTTT-3'); *M* (forward: 5'-ACCCAAGGGACCTTCACT-3', reverse: 5'-GTGTGGGGTTGAGTGTCTTC-3'); and *P* (forward: 5'-GCTAGGGATGGTATAAGAGATGCC-3', reverse: 5'-CTCTGATGTTGGATTGAGAGACACT-3'). Expression of *ACTB* (β -actin) (forward: 5'-CACCAACTGGGACGACAT-3', reverse: 5'-ACAGCCTGGATAGCAACG3') was used for normalization. Relative quantifications were made by the comparative CT ($\Delta\Delta C_T$) method.

2.4. Western Blot

Protein levels were analyzed by a Western blot. Cell pellets were lysed in 1% Triton–1% Sodium Deoxycholate–0.1% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) buffer with protease inhibitors (Complete Mini, Roche, Indianapolis, IN, USA) and protein concentration was determined by the Bicinchoninic acid (BCA) protein assay (Pierce BCA protein assay, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). A total of 10 µg of each protein sample was separated in 10% SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis gels and

subsequently transferred to an immobilon-P membrane (Millipore, Burlington, MA, USA). Primary antibodies for detection of the following proteins were used: actin- β (Ab8224-100, Abcam), HRSV matrix protein (29 M), HRSV G glycoprotein (021/1 G and 021/2 G), HRSV fusion protein (476–510), and HRSV nucleoprotein (79 N) [37,38]. Horseradish-peroxidase-linked anti-rabbit or anti-mouse Ig (Abcam) were used as secondary antibodies. Proteins were visualized by chemiluminescence using the SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher, Rockford, IL, USA) in a ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

2.5. Small Interfering RNA Design

Small interfering RNAs against *DDX58* (*RIG-I*) (ID # s223614) and *TRIM25* (ID # s15206 and ID # s15204) were purchased from Ambion (Thermo Fisher) (Rockford, IL, USA). The latter siRNA (ID # s15204) was found to silence the HRSV fusion protein in addition to *TRIM25*, and it is referred to as *TRIM25/HRSV-F* siRNA (Table 1). Following previously described guidelines [39,40], an siRNA silencing the F glycoprotein alone (*HRSV-F*) (Table 1) was designed and the sequence was sent to Ambion for siRNA synthesis. The siRNA targeting the HRSV nucleoprotein (*HRSV-N*) was also synthesized by Ambion, and it is based on the sequence of the previously reported siRNA ALN-RSV01 [27] (Table 1).

Table 1. Nucleotide sequences of the siRNAs.

Name ^a	Sense Sequence (5'-3') ^b	Antisense Sequence (5'-3') ^b
TRIM25	CAACAAGAAUACACGGAAtt	UUUCCGUGUAUUCUUGUGta
HRSV-F	GCAAAGUGUUAGACCUCAAtt	UUGAGGUCUAAACACUUUGCtg
TRIM25/HRSV-F	CCAUAAGACCUCAAAAACGAtt	UCGUUUUUGAGGUCUAUGGtg
RIG-I	CAAGAAGAGUACCACUUAAtt	UUAAGUGGUACUCUUCUUGta
HRSV-N (ALN-RSV01)	GGCUCUUAGCAAAGUCAAGtt	CUUGACUUUGCUAAGAGCCtt
RIG-I/HRSV-N	GGAAUUGGAGCAAGUUGUtt	AACAACUUGCUCCAUUUCCtc

^a TRIM25: tripartite motif-containing protein 25. RIG-I: retinoic acid-inducible gene-I. HRSV-F: human respiratory syncytial virus fusion protein. HRSV-N: human respiratory syncytial virus nucleoprotein. ^b Dinucleotide overhangs are in lowercase.

Lastly, a bispecific siRNA targeting the HRSV nucleoprotein and RIG-I (*RIG-I/HRSV-N*) was designed using LALIGN software [41]. Human respiratory syncytial virus genome (positive polarity) was aligned with the RIG-I mRNA. A region of 21 nucleotide residues with high identity between the two RNAs was selected and a bispecific siRNA was designed following previously described rules [39,40] and synthesized by Ambion (Figure 1, Table 1).

siRNA TRIM25/HRSV-F		siRNA RIG-I/HRSV-N	
CACCAUAGACCUCAAAAACGA	TRIM25 (5'-3')	GAGGAACUGGAGCAAGUUGUU	RIG-I (5'-3')
::::::::::::::::::::::::::::		::::: ::::::::::::::	
gtGGUAUCUGGAGUUUUGCU	siRNA (3'-5')	ctCCUUUACCUCGUUCAACAA	siRNA (3'-5')
:::::::::::::::::::: :		: :::::::::: ::::::::::	
AGUGUUAGACCUCAAAAACUA	HRSV-F (5'-3')	GCAGAAUUGGAACAAGUUGUU	HRSV-N (5'-3')

Figure 1. Nucleotide sequence of bispecific siRNAs against viral and cellular genes. The 21-nucleotide long sequence of the two bispecific siRNAs (antisense) silencing TRIM25 and HRSV-F (*TRIM25/HRSV-F*) or RIG-I and HRSV-N (*RIG-I/HRSV-N*) is shown. Dinucleotide overhangs are in lowercase. Canonical base pairing with TRIM25, RIG-I, HRSV-F, or HRSV-N mRNAs are represented by colons.

2.6. Small Interfering RNA Silencing

Forty-five thousand A549 cells were seeded in 24-well plates and transfected 24 h later with 6 pmol of control (negative control #2, Ambion, Thermo Fisher) or specific siRNAs and 1 μ L of Lipofectamine RNAiMAX reagent (Invitrogen, Thermo Fisher) per well, following the manufacturer's protocols. Twenty-four hours after transfection, cells were infected with HRSV at a MOI of 3. Additional experiments were done in which cells were first infected at MOI of 3 or 0.1 and then transfected 8 h later.

Cell supernatants for viral titration and cell pellets for RNA and protein extraction were harvested at different hours post-infection, as indicated in the figure legends.

2.7. Cell Viability Assay

Viability of cells transfected with the different siRNAs was determined using an MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium] assay. A549 cells (9×10^3) were seeded onto 96-well plates. The following day, cells were transfected in quintuplicate with the different siRNAs at the same molar concentration as in 2.6. Ten μ L of MTT (5 mg/mL, Calbiochem, San Diego, CA, USA) were added to each well at 0 and 72 h post-transfection, and cells were incubated for 4 h at 37 °C. After the incubation period, 120 μ L per well of isopropanol with 0.04 N HCl were added and the plates were shaken for an additional hour. Absorbance (A) was measured at 570 nm and the survival rate was measured as $SR (\%) = (A_{\text{treatment}}/A_{\text{control}}) \times 100\%$.

3. Results

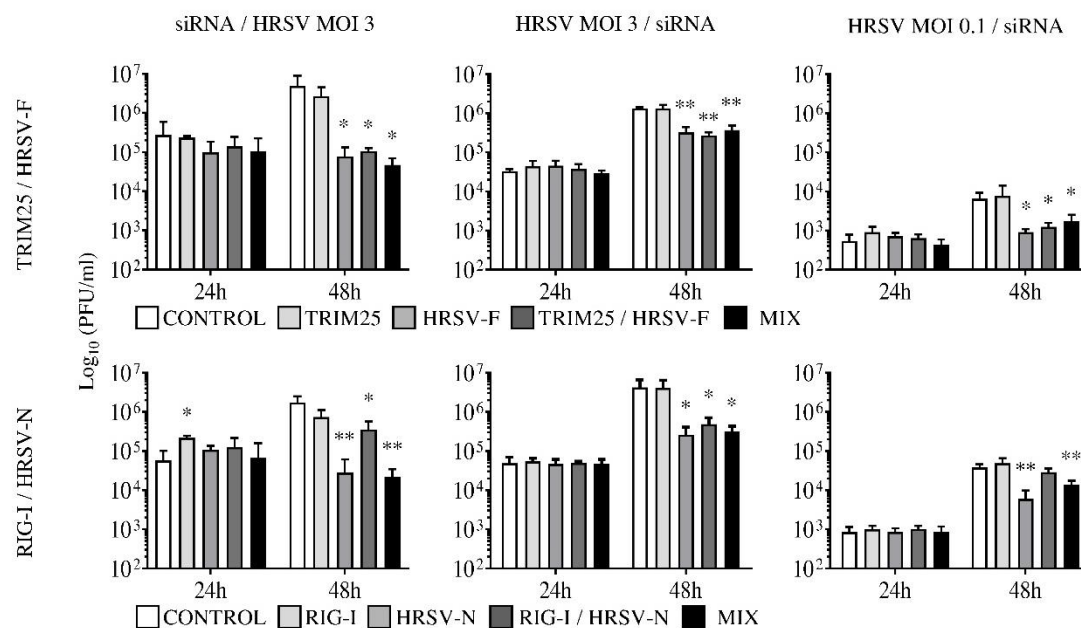
3.1. Alignment of the Human Respiratory Syncytial Virus Genome with Innate Immune Genes and Selection of Bispecific Small Interfering RNAs

Since both virus replication and an inadequate inflammatory response seem to contribute to the severe pathology caused by HRSV, we wondered if it would be possible to design simple molecules to have an effect on the two processes at the same time. Specifically, we focused on designing single bispecific siRNAs able to simultaneously regulate the expression of viral and cellular innate immune genes. To do this, pairwise alignment was performed between the HRSV genome (positive polarity) and mRNAs from different genes involved in the regulation of intracellular immune pathways. These alignments revealed short segments of 12–14 nucleotides with an identical sequence between the virus and some cellular genes. These sequences may serve as targets for siRNAs modulating both virus production and the innate immune response. Based on these sequences, several siRNAs were designed to silence combinations of viral (*NS1*, *N*, *F*, *L*, trailer) and cellular genes (*TNF Alpha Induced Protein 3* (*TNFAIP3/A20*), *Tax1 Binding Protein 1* (*TAX1BP1*), *Cylindromatosis* (*CYLD*), *DEXD/H-Box Helicase 58* (*DDX58/RIG-I*), *TNF Receptor Associated Factor 3* (*TRAF3*), and *Tripartite Motif Containing 25* (*TRIM25*)). Only two out of all the designed siRNAs were able to silence both viral and cellular genes simultaneously with one targeting *TRIM25* and *F* (*TRIM25/HRSV-F*) and the other one targeting *DDX58/RIG-I* and *N* (*RIG-I/HRSV-N*) (Figure 1 and Supplemental Figures S1, S2, and S3). *TRIM25/HRSV-F* is, in fact, a commercial siRNA designed by Ambion (ID # s15204) to silence *TRIM25* that we found also targets *HRSV-F*. *TRIM25/HRSV-F* matched 21 nucleotides out of 21 with *TRIM25* mRNA and 15 nucleotides out of 21 with *HRSV-F* mRNA (Figure 1). *RIG-I/HRSV-N* matched 20 nucleotides out of 21 with *RIG-I* mRNA and 18 nucleotides out of 21 with *HRSV-N* mRNA (Figure 1). The DNA dinucleotide overhangs contributed to base pairing in most cases (Figure 1).

To compare the bispecific siRNAs, two additional monospecific siRNAs were designed and synthesized targeting *F* or *N*, and two others targeting *TRIM25* or *RIG-I* were purchased from Ambion (Table 1 and Supplemental Figures S2 and S3). The *HRSV-N* monospecific siRNA has an identical sequence to the previously described ALN-RSV01 [27]. All siRNAs were 21 nucleotides long, had a DNA dinucleotide overhang (Table 1), targeted sequences inside the coding region of the mRNAs (Supplemental Figures S2 and S3), and silenced the corresponding genes by more than 60% at 48 h post-transfection (Supplemental Figure S1a). *TRIM25* and *RIG-I* downregulation was also measured at 24 h post-transfection (before infection) in the case of cells transfected with *TRIM25*, *RIG-I*, *TRIM25/HRSV-F*, or *RIG-I/HRSV-N* siRNAs. Even at this early post-transfection time, a clear inhibition of the expression of the corresponding genes was observed (Supplemental Figure S1b). None of the siRNAs tested were cytotoxic when transfected in A549 cells and compared to control cells transfected with no siRNA (Supplemental Figure S4).

3.2. Small Interfering RNAs Targeting F or N Inhibit Virus Growth

Cells were silenced with individual or mixed monospecific siRNAs, or with bispecific siRNAs in three distinct conditions of infection/transfection and virus titers were quantified by a plaque assay (Figure 2): (1) transfection of siRNAs and infection 24 h later at an MOI of 3. (2) Infection at an MOI of 3 and siRNA transfection 8 h later. (3) Infection at an MOI of 0.1 and siRNA transfection 8 h later. These three different conditions allow for the testing of three different treatment scenarios: (1) as prophylactic treatment before infection, (2) as therapeutic treatment in which nearly 100% of cells are infected, and (3) as inhibitors of virus growth and spread in conditions in which only about 10% of cells are infected.



Decrease in virus titer at 48 hpi (folds over control)

	siRNA / HRSV MOI 3	HRSV MOI 3 / siRNA	HRSV MOI 0.1 / siRNA
HRSV-F	63.3	4.1	7.1
TRIM25 / HRSV-F	46.8	4.9	5.2
MIX (TRIM25 + HRSV-F)	104.7	3.6	3.8
HRSV-N	61.7	16.3	6.2
RIG-I / HRSV-N	4.9	8.8	1.3
MIX (RIG-I + HRSV-N)	79.2	13.2	2.8

Figure 2. Human respiratory syncytial virus titers in the supernatant of infected cells transfected with the different siRNAs (upper panel: control, TRIM25, HRSV-F, TRIM25/HRSV-F or a combination of TRIM25 and HRSV-F (MIX); lower panel: control, RIG-I, HRSV-N, RIG-I/HRSV-N or a combination of RIG-I and HRSV-N (MIX)). Cells were transfected with the siRNAs before or after virus infection and the supernatant was collected at 24 and 48 h post infection (hpi). Small interfering RNA/HRSV multiplicity of infection (MOI) 3 (siRNA/HRSV MOI 3): infection was carried out at 24 h post-transfection at an MOI of 3. Human respiratory syncytial virus MOI 3/siRNA (HRSV MOI 3/siRNA): cells were infected at an MOI of 3 and then transfected eight hours later. Human respiratory syncytial virus MOI 0.1/siRNA (HRSV MOI 0.1/siRNA): infection was done at an MOI of 0.1 and transfection was carried out eight hours later. Data represent the mean and standard deviation from three independent experiments. Comparisons between groups were done by the *t*-test: *, $p < 0.05$ and **, $p < 0.01$. For 48 hpi, the decrease in the virus titer (fold over control) for each siRNA and condition is shown in the table below the graphics.

Under all three conditions, when compared to cells transfected with a control siRNA, a significant decrease in virus titers was observed at 48 h post infection (hpi) with bispecific siRNAs (TRIM25/HRSV-F or RIG-I/HRSV-N), monospecific siRNAs targeting viral F (HRSV-F) or N (HRSV-N), or mixtures of siRNAs against viral F or N (TRIM25 + HRSV-F or RIG-I + HRSV-N) (Figure 2). No significant decrease in virus titers was observed with siRNAs targeting TRIM25 or RIG-I alone (Figure 2).

Reduction in virus titers were, however, about 10× greater when the siRNAs were applied before the infection than after the infection (Figure 2). Administration of the siRNAs before HRSV prevented the progression of the infection, since virus titers did not increase from 24 hpi to 48 hpi (Figure 2). By contrast, virus titers increased from 24 hpi to 48 hpi when siRNAs were transfected after HRSV infection (Figure 2). This increase was less evident in the case of siRNAs targeting F and infections at an MOI of 0.1 (Figure 2).

The siRNAs HRSV-F, TRIM-25/HRSV-F, and the combination of TRIM25 plus HRSV-F had a similar effect on virus production (Figure 2). Likewise, HRSV-N and the combination of RIG-I plus HRSV-N inhibited virus growth to the same extent, even though the bispecific RIG-I/HRSV-N was a little less effective, especially when administered prior to infection (Figure 2).

3.3. Silencing N, but Not F, Leads to a Generalized Inhibition of Human Respiratory Syncytial Virus RNA and Proteins

Since a greater inhibition in the viral titer was observed when siRNA transfection was performed before infection, we further investigated the levels of several viral mRNAs and proteins under this condition (Figures 3 and 4).

While having a similar effect on viral titers, siRNAs targeting F or N differed substantially in their impact on viral mRNA and protein expression. The siRNAs targeting F (HRSV-F, TRIM25/HRSV-F and the combination of TRIM25 plus HRSV-F) significantly decreased the levels of the F mRNA, but not the other viral gene transcripts, both at 24 hpi and 48 hpi (Figure 3A). By contrast, siRNAs targeting N (HRSV-N, RIG-I/HRSV-N and the combination of RIG-I plus HRSV-N) drastically reduced the mRNA levels of all viral proteins tested (N, F, NS1, L, G, M, and P), both at 24 hpi and 48 hpi (Figure 3B). Again, the bispecific siRNA RIG-I/HRSV-N was a little less effective than HRSV-N or the combination of RIG-I plus HRSV-N at reducing mRNA (Figure 3B). As expected, siRNAs that targeted TRIM25 or RIG-I alone did not reduce viral mRNA levels (Figure 3).

Essentially, identical results were observed when the accumulation of viral proteins was analyzed by Western blotting (Figure 4). Silencing with HRSV-F, TRIM-25/HRSV-F, and the combination of TRIM25 plus HRSV-F resulted in a large decrease in F protein accumulation, but they had no effect on the levels of the other viral proteins (Figure 4A). By contrast, HRSV-N, RIG-I/HRSV-N, and the combination of RIG-I plus HRSV-N siRNAs silenced the expression of all viral proteins studied (Figure 4B). Once more, the effect of the bispecific RIG-I/HRSV-N, although substantial, was slightly less than that of HRSV-N or the combination siRNAs (Figure 4B). As anticipated, neither TRIM25 nor RIG-I siRNAs reduced the accumulation of viral proteins (Figure 4).

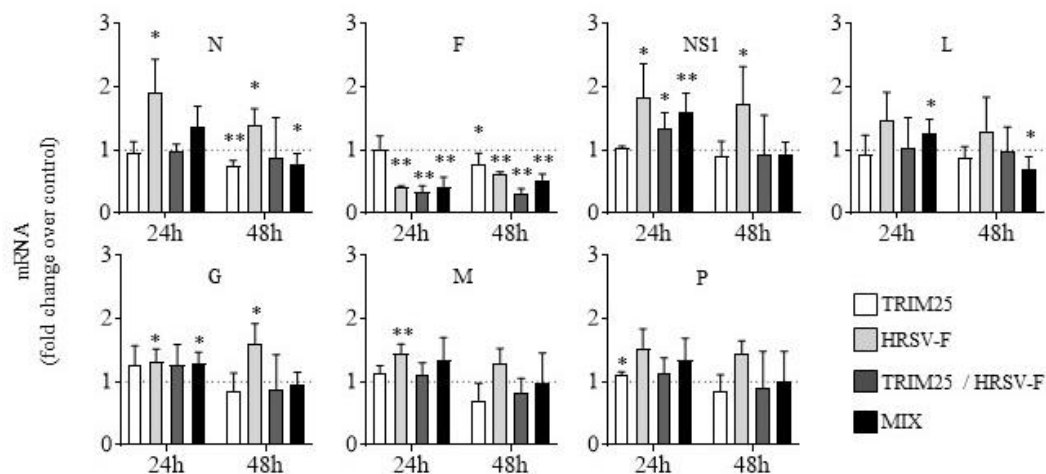
3.4. Targeting Human Respiratory Syncytial Virus Nucleoprotein with Small Interfering RNAs Drastically Reduces the Cellular Innate Immune Response While Human Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein Silencing Has Only a Moderate Effect

The intracellular innate immune response induced by HRSV was analyzed under the three different conditions of siRNA transfection by measuring mRNAs levels of interleukin 6 (IL6), ISG15 ubiquitin-like modifier (ISG15), tumor necrosis factor- α (TNF- α), C-C motif chemokine ligand 5 (CCL5), and interferon beta 1 (IFN- β).

In general, targeting HRSV F with HRSV-F siRNA, TRIM25/HRSV-F siRNA, or the combination of HRSV-F plus TRIM25 siRNAs moderately reduced the expression of IL6, ISG15, TNF- α , CCL5, and IFN- β at 48 hpi, but not at 24 hpi (Figure 5). However, ISG15 levels were not significantly reduced in the cases in which the siRNAs were administered before infection (siRNA/HRSV MOI 3, Figure 5A)

or when infection at MOI 0.1 was carried out before siRNA transfection (HRSV MOI 0.1/siRNA, Figure 5C). When the siRNAs HRSV-F, TRIM25/HRSV-F, or the combination of TRIM25 plus HRSV-F were transfected before infection, the levels of IL6, CCL5, and IFN- β mRNAs increased significantly at 24 hpi (Figure 5A). Tripartite motif-containing protein 25 only silencing did not result in a decrease in the innate immune response in any case (Figure 5).

A. TRIM25 / HRSV-F



B. RIG-I / HRSV-N

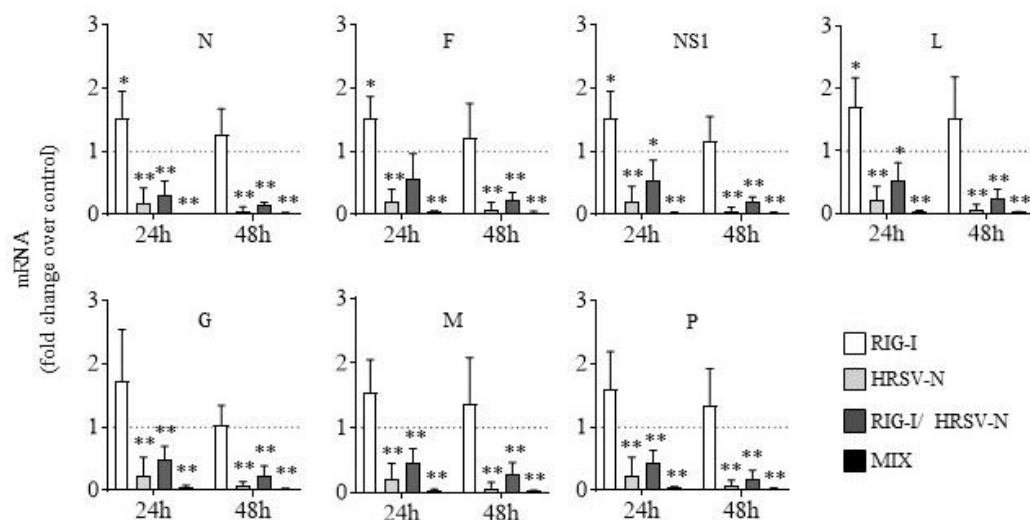


Figure 3. Relative levels of HRSV mRNAs (N, F, NS1, L, G, M, and P) in cells transfected with the different siRNAs. **(A)** Cells transfected with the siRNAs TRIM25, HRSV-F, TRIM25/HRSV-F or a combination of TRIM25 plus HRSV-F (MIX). **(B)** Cells transfected with the siRNAs RIG-I, HRSV-N, RIG-I/HRSV-N or a combination of RIG-I plus HRSV-N (MIX). Cells were transfected with the siRNAs and infected 24 h later at an MOI of 3. Levels of HRSV mRNAs were quantified by quantitative real time-PCR at 24 and 48 hpi and represented as fold over viral mRNAs expressed in cells transfected with a control siRNA. Data represent the mean and standard deviation from three independent experiments. Comparisons between groups were done by the *t*-test: *, $p < 0.05$ and **, $p < 0.01$.

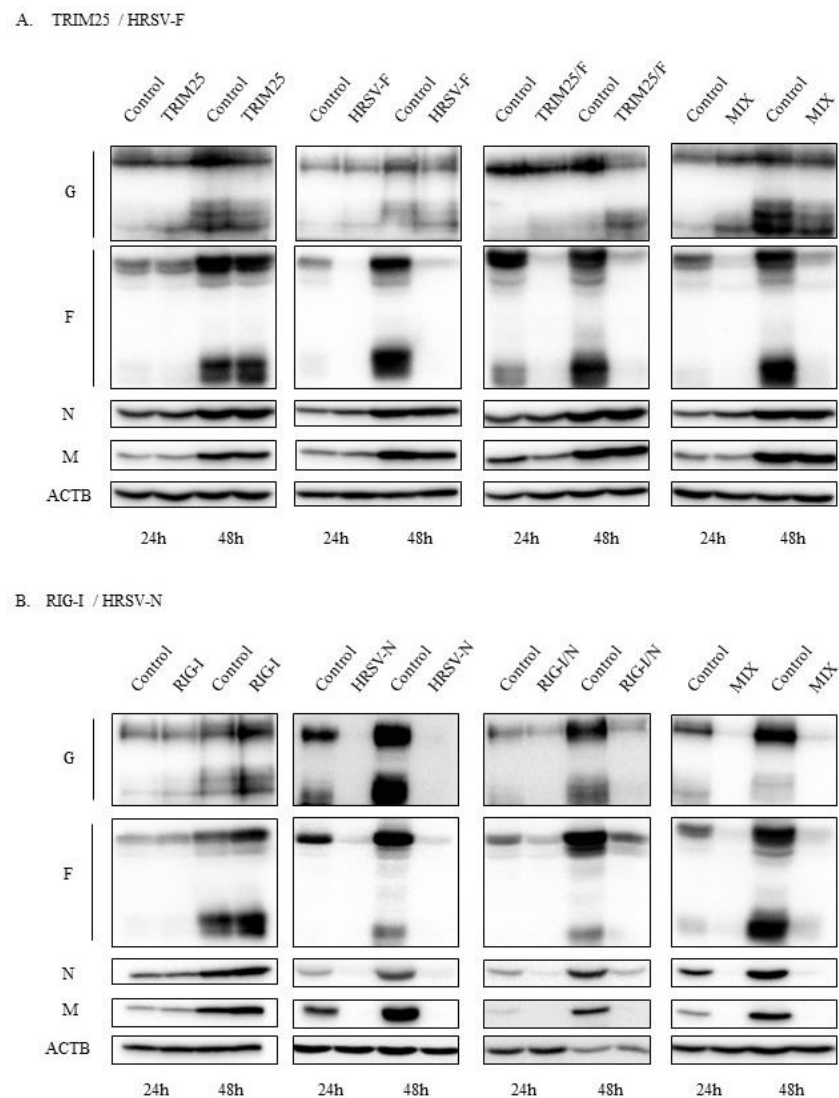
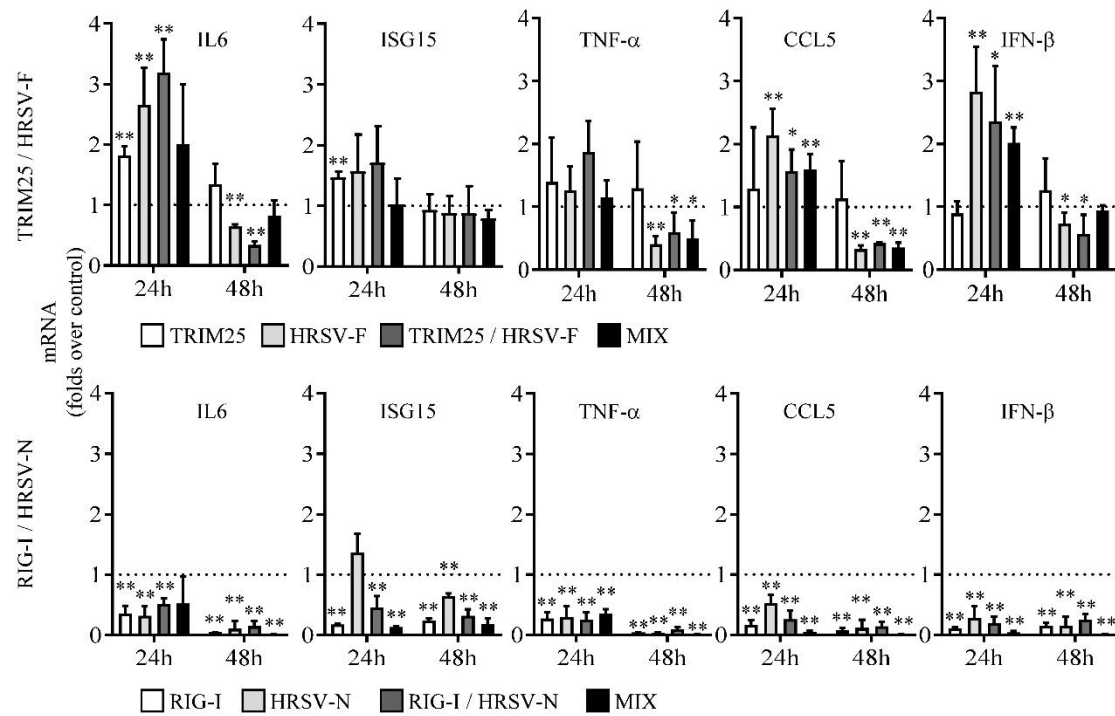


Figure 4. Levels of HRSV proteins (G, F, N, and M) in cells transfected with different siRNAs. **(A)** Cells transfected with the siRNAs TRIM25, HRSV-F, TRIM25/HRSV-F or a combination of TRIM25 plus HRSV-F (MIX). **(B)** Cells transfected with the siRNAs RIG-I, HRSV-N, RIG-I/HRSV-N or a combination of RIG-I plus HRSV-N (MIX). Cells were transfected with the siRNAs and infected 24 h later at an MOI of 3. Protein extracts were done at 24 and 48 hpi. The Western blot was utilized to analyze the cells using specific antibodies. The levels of β -actin (ACTB) are shown for comparison.

By contrast, when the expression of HRSV N was reduced by the siRNAs HRSV-N, RIG-I/HRSV-N, and the combination of RIG-I plus HRSV-N, a strong decrease in the innate immune response was observed at 48 hpi (Figure 5). In addition, this response was also inhibited at 24 hpi when siRNAs were administered before the infection (Figure 5A), and, in some cases, when delivered after infection (Figure 5B,C). Unlike what happened with the monospecific siRNA targeting TRIM25, RIG-I siRNA alone was able to considerably reduce the innate immune response (Figure 5). This discrepancy between the effects of TRIM25 and RIG-I siRNAs may be related to the fact that TRIM25 has a dual role in RIG-I regulation, since it also negatively regulates RIG-I through an indirect mechanism [15]. In addition, other E3 ubiquitin ligases may compensate for the TRIM25 downregulation [12].

A. siRNA / HRSV MOI 3



B. HRSV MOI 3 / siRNA

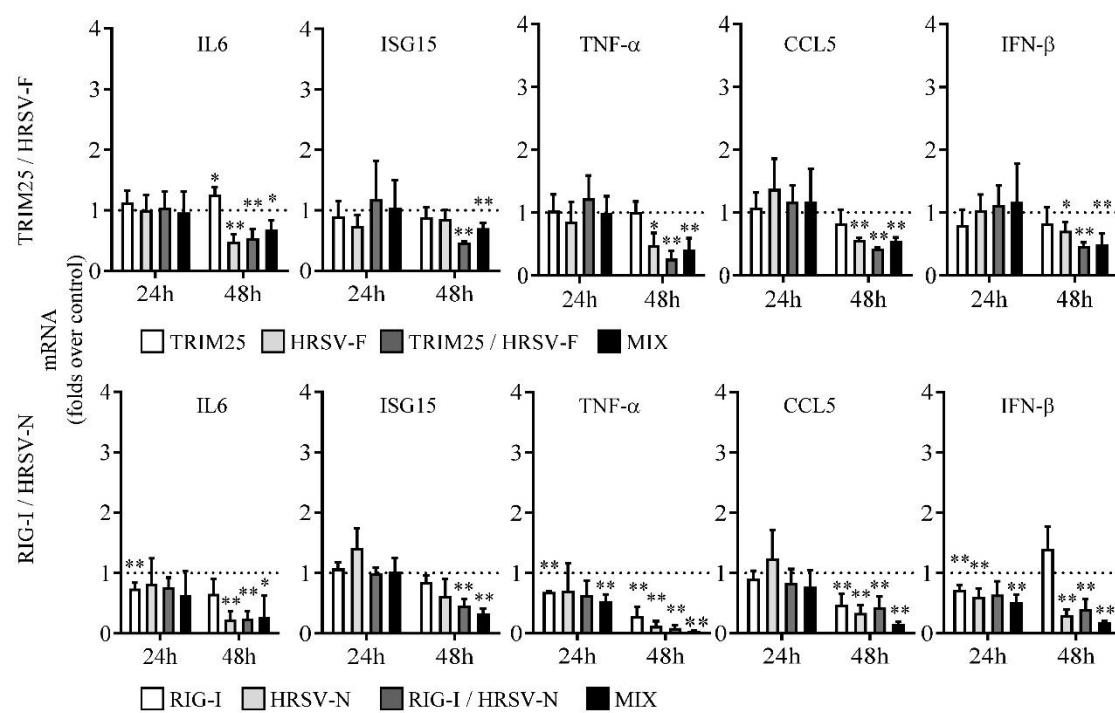


Figure 5. Cont.

C. HRSV MOI 0.1 / siRNA

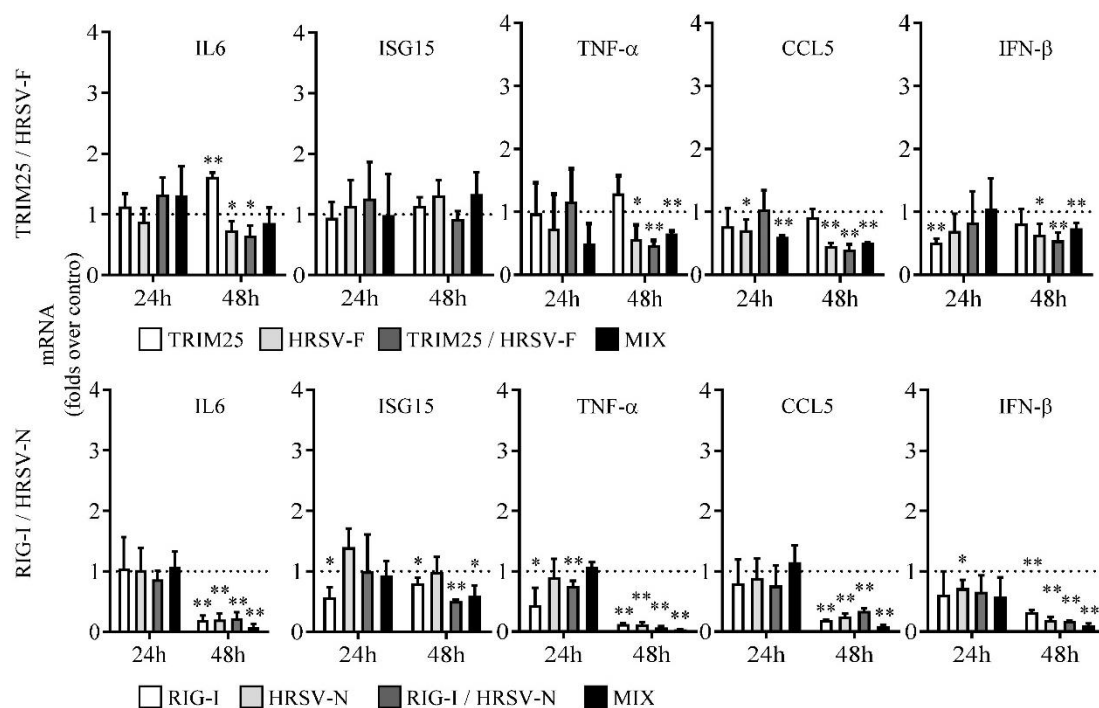


Figure 5. Relative levels of mRNAs from genes involved in the antiviral immune response in cells transfected with the different siRNAs. (A) Cells were transfected with the indicated siRNAs and infected 24 h later at a MOI of 3. (B) Cells were infected at a MOI of 3 and transfected 8 h later with the indicated siRNAs. (C) Cells were infected at a MOI of 0.1 and transfected 8 h later with the indicated siRNAs. Transfection/infection were done as in Figure 2. Levels of mRNAs were quantified by qRT-PCR at 24 and 48 hpi and represented as fold over mRNAs expressed in cells transfected with a control siRNA. Data represent the mean and standard deviation from three independent experiments. Comparisons between groups were done by using the *t*-test: *, $p < 0.05$ and **, $p < 0.01$.

4. Discussion

While great efforts are being made to find prophylactic and therapeutic treatments for HRSV and to understand the role of the immune response in the development of the HRSV-induced pathology, no approved vaccine or effective therapeutic treatment is currently available for this virus. In the search for novel treatments for HRSV, we have explored the idea of inhibiting both the virus replication and the innate immune response by designing bispecific siRNAs able to simultaneously silence the expression of viral proteins and cellular proteins involved in pathways leading to the inflammatory/antiviral response against HRSV. Alignment of the mRNA sequences of some of these cellular proteins with the HRSV genome (positive polarity) showed that there were short segments highly conserved between them that could be targeted by bispecific siRNAs. Based on this, two siRNAs were obtained that silenced TRIM25 and the HRSV F while also silencing RIG-I and HRSV N.

Small interfering RNAs have several advantages as potential treatments against diverse pathogens. They are cheap and easy to produce, they can be lyophilized to increase their stability, and they are highly specific. An additional advantage in the case of respiratory viruses is that they can be administered locally to the respiratory tract. Furthermore, they can be easily delivered as combinations of siRNAs targeting distinct regions in the same or different viral genes. This will improve the efficacy of the treatment while expanding the spectrum of susceptible genotypes and limiting the emergence of treatment-resistant variants [42]. Therefore, it is not surprising that the number of published clinical studies using siRNAs has increased remarkably in recent years [19]. Despite all of this, off-target effects of siRNAs still remain an important problem to deal with. We performed a cytotoxic assay that ruled

out any mayor effect of the siRNAs tested on the cell viability. In addition, these siRNAs do not seem to induce a significant interferon response leading to a general translation arrest since: (1) in the case of cells transfected with Control, RIG-I and TRIM25 siRNAs, viral protein levels increased from 24 hpi. to 48 hpi (Figure 4); (2) HRSV-F and TRIM25/HRSV-F siRNAs inhibited only the expression of the F protein, but not the accumulation of the other viral proteins (Figure 4); and (3) the antiviral activity of HRSV-N (ALN-RSV01) has not been shown to be mediated by interferon [27]. However, it is difficult to completely rule out any off-target effect of siRNAs on host genes, since the siRNA guide strand may silence unintended mRNAs by a mechanism similar to micro RNA silencing, in which only partial sequence complementarity, mainly mediated by the seed sequence (nucleotides 2–8), is required [39].

Both virus replication and an inadequate immune response seem to be responsible for the pathology caused by HRSV [43]. Thus, targeting these two elements of HRSV infection could improve virus clearance and ameliorate disease symptoms. Khaitov et al. have reported that the combined administration of siRNAs targeting HRSV and IL4 reduced inflammation in a mouse model of asthma exacerbation, in which mice were sensitized with ovalbumin before HRSV infection [44]. The host immunity against HRSV is initiated in the infected pulmonary epithelial cells, the primary targets of HRSV infection. These cells secrete pro-inflammatory cytokines and chemokines that promote tissue inflammation and contribute to the induction of the subsequent adaptive response. Therefore, in the same lung epithelial cell, both HRSV replication and the early innate immune response can be targeted at the same time. We have used a lung epithelial cell line to analyze the simultaneous inhibition of HRSV growth and the cellular immune response with bispecific siRNAs. Although bispecific siRNAs and the combination of siRNAs against both the virus and the innate immune genes reduced virus production and the inflammatory/antiviral response in infected cells, it was found that monospecific siRNAs silencing viral genes alone reduced the intracellular innate response. However, our results showed that the quantitative impact of these siRNAs on the immune response differed considerably. This may be related to the role of the viral protein in the life cycle of the virus, as pointed by Bitko and Barik [21]. Thus, the inhibition of N expression reduced viral replication and, therefore, the amount of total viral RNAs. Since these RNAs act as substrates for PRRs [45], N silencing resulted in a drastic reduction in the cellular innate immune response. By contrast, silencing HRSV F, which is not involved in HRSV replication/transcription, did not result in a generalized viral RNA decrease, and intracellular signaling mediated by PRRs continued, to some extent, in these siRNA-transfected cells. This strongly indicates that targeting distinct HRSV genes would lead to different inflammatory/antiviral response outcomes without compromising viral titer reduction. Our results are in line with those of a recent report in which the interferon response induced by HRSV in epithelial cells was modulated by target-specific antiviral treatment with small-molecule inhibitors [46]. An HRSV polymerase (L) inhibitor leading to the accumulation of abortive viral RNAs induced the upregulation of interferon-stimulated genes, while another L inhibitor leading to overall suppression of HRSV RNA synthesis resulted in the attenuation of the RIG-I-like pathway [46].

The immune response against HRSV is complex and several viral and host factors have been related to HRSV immunopathology [43]. Protective immunity includes virus-neutralizing antibodies, mostly against the F protein [2]. However, it is not clear if a potent early innate immune response is beneficial or detrimental to prevent from severe HRSV infections [47]. Furthermore, it is probable that some aspects of that response are beneficial and others are not, and this may depend on the infected person. Therefore, although we have focused on reducing an early innate response against the HRSV, it is possible that, in some circumstances, a strong response is required. In this case, it would be desirable that the silencing of the HRSV genes does not significantly reduce this response. In addition, high expression of the viral glycoproteins (F and G), which are targets for neutralizing antibodies, should be maintained. As shown in the present report, silencing HRSV N drastically reduced the innate immune response, as well as the expression of F and G. On the contrary, silencing F had a moderate effect on the innate immune response but drastically reduced the expression of the protein F, which is the main target for neutralizing antibodies. Previous studies using siRNAs against HRSV

have focused on proteins involved in replication/transcription (N, P, and M2-2) [26,27,30,32,34] or the fusion F protein [30,33]. In all cases, a substantial decrease in virus titers has been reported. However, in most reports, the early innate immune response has not been assessed, which precludes a direct comparison with our data. In any case, it would be interesting to silence other HRSV genes not involved in virus replication/transcription or the induction of neutralizing antibodies, such as the matrix (M). M silencing would allow both the accumulation of enough RNA and viral glycoproteins for the development of the innate immune response and the induction of neutralizing antibodies. An additional advantage of the HRSV M protein is that it is one of the most conserved proteins of the virus [48], so it would be easier to design an siRNA effective against most HRSV isolates. Another approach is targeting non-structural HRSV genes that antagonize the host IFN response. For example, it has been reported that an siRNA against the HRSV NS1 reduced virus replication in A549 cells and mice, while upregulating the expression of IFN- β [25]. However, the reduction in HRSV production may have been due to the upregulation of the innate immune response rather than due to the direct silencing of viral RNA [25].

As mentioned before, siRNAs have several advantages, including that they can be easily designed to target almost any viral or cellular gene. This offers a plethora of alternatives to treat viral or other pathogen infections while fine-tuning the associated immune/antiviral response. Since intracellular immune pathways are tightly regulated by positive and negative regulators, different combinations of siRNAs against viral and cellular genes can be envisaged to inhibit virus growth and to reduce or potentiate the inflammatory/antiviral response as needed. However, this versatility will likely require the use of combination of siRNAs against viral and cellular siRNAs rather than bispecific siRNAs since the latter are restricted by the existence of sequence similarities between the viral and cellular genes of interest.

Lastly, as shown in the present study and in other studies [25,27,32], siRNAs against HRSV are highly effective when administered before infection, but they also work when delivered after infection, which suggests that they could be useful both in prophylactic and therapeutic treatments.

5. Conclusions

In conclusion, although several studies have reported that different siRNAs against HRSV reduced virus growth, our results show that the effect of those siRNAs should be assessed not only by taking into account virus replication but also by taking into account their effects on the immune response. In addition, different combinations of viral and cellular gene silencing may provide us with specific tools to control the undesired aspect of the immune response against HRSV while potentiating the protective ones. This suggests new avenues to explore in the design of novel antiviral treatments based on siRNAs, which may contribute to a better management of HRSV infections.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2218-273X/9/5/165/s1>, Supplemental Figure S1: (a) Relative levels of TRIM25 or HRSV-F (upper panel) and RIG-I or HRSV-N (lower panel) in cells transfected with the siRNAs shown in parentheses. Levels of mRNAs were quantified by qRT-PCR 48 h post-transfection and represented as folds over mRNAs expressed in cells transfected with a control siRNA. Data represent the mean and standard deviation from three independent experiments. (b) Relative levels of TRIM25 or RIG-I in cells silenced with the siRNAs shown in parenthesis. Levels of mRNAs were quantified by qRT-PCR 24 h post-transfection (before infection) and represented as folds over mRNAs expressed in cells transfected with a control siRNA. Data represent the mean and standard deviation from triplicate transfections. Supplemental Figure S2: Coding Sequences (CDS) of TRIM25 and HRSV-F showing the target sequence of TRIM25 siRNA (green), HRSV-F siRNA (blue), and TRIM25/HRSV-F siRNA (red). Mismatches between target genes and the siRNA are in lowercase. Supplemental Figure S3: Coding Sequences (CDS) of RIG-I and HRSV-N showing the target sequence of RIG-I siRNA (green), HRSV-N siRNA (blue), and RIG-I/HRSV-N siRNA (red). Mismatches between target genes and the siRNA are in lowercase. Supplemental Figure S4: Percentage of viable cells (survival rate, SR) transfected with the different siRNAs at 0 and 72 h post-transfection. An MTT assay determined cell viability. Data represent the mean and standard deviation from quintuplicate transfections. A dilution of 1:2000 (from a 30% stock) of H₂O₂ was used as a positive control of cell damage.

Author Contributions: Conceptualization: M.M.-V. and I.M. Methodology: M.M.-V. and I.M. Formal analysis: M.M.-V. and I.M. Investigation: M.M.-V. and I.M. Resources: M.M.-V. and I.M. Data curation: M.M.-V. and I.M.

Writing-Original Draft Preparation: M.M.-V. and I.M. Writing-Review and Editing: S.R. and I.M. Visualization: I.M. Supervision: S.R. and I.M. Project Administration: I.M. Funding Acquisition: I.M.

Funding: This research was funded by the Instituto de Salud Carlos III, gran number PI15CIII/0024 to IM.

Acknowledgments: The Instituto de Salud Carlos III (grant PI15CIII/0024) supported this work.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Afonso, C.L.; Amarasinghe, G.K.; Bányai, K.; Bào, Y.; Basler, C.F.; Bavari, S.; Bejerman, N.; Blasdel, K.R.; Briand, F.-X.; Briese, T.; et al. Taxonomy of the order Mononegavirales: Update 2016. *Arch. Virol.* **2016**, *161*, 2351–2360. [\[CrossRef\]](#)
2. Collins, P.L.; Karron, R.A. Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus. In *Fields Virology*; David, P.M.H., Knipe, M., Eds.; LWW: Philadelphia, PA, USA, 2013; pp. 1087–1123.
3. Spann, K.M.; Tran, K.C.; Collins, P.L. Effects of nonstructural proteins NS1 and NS2 of human respiratory syncytial virus on interferon regulatory factor 3, NF-kappaB, and proinflammatory cytokines. *J. Virol.* **2005**, *79*, 5353–5362. [\[CrossRef\]](#)
4. Swedan, S.; Andrews, J.; Majumdar, T.; Musiyenko, A.; Barik, S. Multiple Functional Domains and Complexes of the Two Nonstructural Proteins of Human Respiratory Syncytial Virus Contribute to Interferon Suppression and Cellular Location. *J. Virol.* **2011**, *85*, 10090–10100. [\[CrossRef\]](#)
5. Falsey, A.R.; Hennessey, P.A.; Formica, M.A.; Cox, C.; Walsh, E.E. Respiratory Syncytial Virus Infection in Elderly and High-Risk Adults. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 1749–1759. [\[CrossRef\]](#)
6. Walsh, E.E. Respiratory Syncytial Virus Infection: An Illness for All Ages. *Clin. Chest Med.* **2017**, *38*, 29–36. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Ramaswamy, M.; Groskreutz, D.J.; Look, D.C. Recognizing the Importance of Respiratory Syncytial Virus in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *COPD J. Chronic Obstr. Pulm. Dis.* **2009**, *6*, 64–75. [\[CrossRef\]](#)
8. Mohapatra, S.S.; Boyapalle, S. Epidemiologic, Experimental, and Clinical Links between Respiratory Syncytial Virus Infection and Asthma. *Clin. Microbiol. Rev.* **2008**, *21*, 495–504. [\[CrossRef\]](#)
9. Nair, H.; Nokes, D.J.; Gessner, B.D.; Dherani, M.; Madhi, S.A.; Singleton, R.J.; O'Brien, K.L.; Roca, A.; Wright, P.F.; Bruce, N.; et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: A systematic review and meta-analysis. *Lancet* **2010**, *375*, 1545–1555. [\[CrossRef\]](#)
10. Shi, T.; McAllister, D.A.; O'Brien, K.L.; Simões, E.A.F.; Madhi, S.A.; Gessner, B.D.; Polack, F.P.; Balsells, E.; Acacio, S.; Aguayo, C.; et al. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: A systematic review and modelling study. *Lancet* **2017**, *390*, 946–958. [\[CrossRef\]](#)
11. Sun, Y.; Lopez, C.B. The innate immune response to RSV: Advances in our understanding of critical viral and host factors. *Vaccine* **2017**, *35*, 481–488. [\[CrossRef\]](#)
12. Patel, J.R.; García-Sastre, A. Activation and regulation of pathogen sensor RIG-I. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2014**, *25*, 513–523. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Liu, P.; Jamaluddin, M.; Li, K.; Garofalo, R.P.; Casola, A.; Brasier, A.R. Retinoic acid-inducible gene I mediates early antiviral response and Toll-like receptor 3 expression in respiratory syncytial virus-infected airway epithelial cells. *J. Virol.* **2007**, *81*, 1401–1411. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Gack, M.U.; Shin, Y.C.; Joo, C.-H.; Urano, T.; Liang, C.; Sun, L.; Takeuchi, O.; Akira, S.; Chen, Z.; Inoue, S.; et al. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nat. Cell Biol.* **2007**, *446*, 916–920. [\[CrossRef\]](#)
15. Martín-Vicente, M.; Medrano, L.M.; Resino, S.; García-Sastre, A.; Martínez, I. TRIM25 in the Regulation of the Antiviral Innate Immunity. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 1187. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Shook, B.C.; Lin, K. Recent Advances in Developing Antiviral Therapies for Respiratory Syncytial Virus. *Top. Chem.* **2017**, *375*, 40. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Graham, B.S. Vaccine development for respiratory syncytial virus. *Curr. Opin. Virol.* **2017**, *23*, 107–112. [\[CrossRef\]](#)

18. Xie, J.; Long, X.; Gao, L.; Chen, S.; Zhao, K.; Zhou, N.; Zang, N.; Deng, Y.; Ren, L.; Wang, L.; et al. Respiratory Syncytial Virus Nonstructural Protein 1 Blocks Glucocorticoid Receptor Nuclear Translocation by Targeting IPO13 and May Account for Glucocorticoid Insensitivity. *J. Infect. Dis.* **2017**, *217*, 35–46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Potaczek, D.P.; Garn, H.; Unger, S.D.; Renz, H. Antisense molecules: A new class of drugs. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2016**, *137*, 1334–1346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Ballarin-Gonzalez, B.; Thomsen, T.B.; Howard, K.A. Clinical translation of RNAi-based treatments for respiratory diseases. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2013**, *3*, 84–99. [[CrossRef](#)]
21. Bitko, V.; Barik, S. Phenotypic silencing of cytoplasmic genes using sequence-specific double-stranded short interfering RNA and its application in the reverse genetics of wild type negative-strand RNA viruses. *BMC Microbiol.* **2001**, *1*, 34. [[CrossRef](#)]
22. Novina, C.D.; Murray, M.F.; Dykxhoorn, D.M.; Beresford, P.J.; Riess, J.; Lee, S.K.; Collman, R.G.; Lieberman, J.; Shankar, P.; Sharp, P.A. siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat. Med.* **2002**, *8*, 681–686. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Ge, Q.; Filip, L.; Bai, A.; Nguyen, T.; Eisen, H.N.; Chen, J. Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 8676–8681. [[CrossRef](#)]
24. Tompkins, S.M.; Lo, C.-Y.; Tumpey, T.M.; Epstein, S.L. Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 8682–8686. [[CrossRef](#)]
25. Zhang, W.; Yang, H.; Kong, X.; Mohapatra, S.; San Juan-Vergara, H.; Hellermann, G.; Behera, S.; Singam, R.; Lockey, R.F.; Mohapatra, S.S. Inhibition of respiratory syncytial virus infection with intranasal siRNA nanoparticles targeting the viral NS1 gene. *Nat. Med.* **2005**, *11*, 56–62. [[CrossRef](#)]
26. DeVincenzo, J.; Cehelsky, J.; Alvarez, R.; Elbashir, S.; Harborth, J.; Toudjarska, I.; Nechev, L.; Murugaiah, V.; Vliet, A.; Vaishnav, A. Evaluation of the safety, tolerability and pharmacokinetics of ALN-RSV01, a novel RNAi antiviral therapeutic directed against respiratory syncytial virus (RSV). *Antivir. Res.* **2008**, *77*, 225–231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Alvarez, R.; Elbashir, S.; Borland, T.; Toudjarska, I.; Hadwiger, P.; John, M.; Roehl, I.; Morskaya, S.S.; Martinello, R.; Kahn, J.; et al. RNA Interference-Mediated Silencing of the Respiratory Syncytial Virus Nucleocapsid Defines a Potent Antiviral Strategy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 3952–3962. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. DeVincenzo, J.; Lambkin-Williams, R.; Wilkinson, T.; Cehelsky, J.; Nochur, S.; Walsh, E.; Meyers, R.; Gollob, J.; Vaishnav, A. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of an RNAi-based therapy directed against respiratory syncytial virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 8800–8805. [[CrossRef](#)]
29. Zamora, M.R.; Budev, M.; Rolfe, M.; Gottlieb, J.; Humar, A.; DeVincenzo, J.; Vaishnav, A.; Cehelsky, J.; Albert, G.; Nochur, S.; et al. RNA Interference Therapy in Lung Transplant Patients Infected with Respiratory Syncytial Virus. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2011**, *183*, 531–538. [[CrossRef](#)]
30. Malekshahi, S.S.; Salimi, V.; Arefian, E.; Fatemi-Nasab, G.; Adjaminejad-Fard, S.; Yavarian, J.; Mokhtari-Azad, T. Inhibition of Respiratory Syncytial Virus Replication by Simultaneous Targeting of mRNA and Genomic RNA Using Dual-Targeting siRNAs. *Mol. Biotechnol.* **2016**, *58*, 767–775. [[CrossRef](#)]
31. Gottlieb, J.; Zamora, M.R.; Hodges, T.; Musk, A.; Sommerwerk, U.; Dilling, D.; Arcasoy, S.; DeVincenzo, J.; Karsten, V.; Shah, S.; et al. ALN-RSV01 for prevention of bronchiolitis obliterans syndrome after respiratory syncytial virus infection in lung transplant recipients. *J. Heart Lung Transplant.* **2016**, *35*, 213–221. [[CrossRef](#)]
32. Bitko, V.; Musiyenko, A.; Shulyayeva, O.; Barik, S. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat. Med.* **2005**, *11*, 50–55. [[CrossRef](#)]
33. Vig, K.; Lewis, N.; Moore, E.G.; Pillai, S.; Dennis, V.A.; Singh, S.R. Secondary RNA Structure and its Role in RNA Interference to Silence the Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein Gene. *Mol. Biotechnol.* **2009**, *43*, 200–211. [[CrossRef](#)]
34. Chin, V.; Aziz, N.A.A.; Hudu, S.A.; Harmal, N.S.; Syahrilnizam, A.; Jalilian, F.A.; Zamberi, S.; Kin, C.V. Design and validation of small interfering RNA on respiratory syncytial virus M2-2 gene: A potential approach in RNA interference on viral replication. *J. Virol. Methods* **2016**, *236*, 117–125. [[CrossRef](#)]
35. Martinez, I.; Dominguez, O.; Melero, J.A.; Lombardía, L.; García-Barreno, B. Distinct gene subsets are induced at different time points after human respiratory syncytial virus infection of A549 cells. *J. Gen. Virol.* **2007**, *88*, 570–581. [[CrossRef](#)]
36. Mbiguino, A.; Menezes, J. Purification of human respiratory syncytial virus: Superiority of sucrose gradient over percoll, renografin, and metrizamide gradients. *J. Virol. Methods* **1991**, *31*, 161–170. [[CrossRef](#)]

37. Mart, I.; Dopazo, J.; Melero, J.A. Antigenic structure of the human respiratory syncytial virus G glycoprotein and relevance of hypermutation events for the generation of antigenic variants. *J. Virol.* **1997**, *78*, 2419–2429.
38. García-Barreno, B.; Palomo, C.; Peñas, C.; Delgado, T.; Perez-Breña, P.; Melero, J.A. Marked differences in the antigenic structure of human respiratory syncytial virus F and G glycoproteins. *J. Virol.* **1989**, *63*, 925–932.
39. Kamola, P.J.; Nakano, Y.; Takahashi, T.; Wilson, P.A.; Ui-Tei, K. The siRNA Non-seed Region and Its Target Sequences Are Auxiliary Determinants of Off-Target Effects. *PLoS Comput. Biol.* **2015**, *11*, 1004656. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Alagia, A.; Eritja, R. siRNA and RNAi optimization. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2016**, *7*, 316–329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Chojnacki, S.; Cowley, A.; Lee, J.; Foix, A.; Lopez, R. Programmatic access to bioinformatics tools from EMBL-EBI update: 2017. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, W550–W553.
42. Brodskaya, A.V.; Timin, A.S.; Gorshkov, A.N.; Muslimov, A.R.; Bondarenko, A.B.; Tarakanchikova, Y.V.; Zbrodskaya, Y.A.; Baranovskaya, I.L.; Il'Inskaja, E.V.; Sakhenberg, E.I.; et al. Inhibition of influenza A virus by mixed siRNAs, targeting the PA, NP, and NS genes, delivered by hybrid microcarriers. *Antivir. Res.* **2018**, *158*, 147–160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Collins, P.L.; Graham, B.S. Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis. *J. Virol.* **2008**, *82*, 2040–2055. [[CrossRef](#)]
44. Khaitov, M.R.; Shilovskiy, I.P.; Nikonova, A.A.; Shershakova, N.N.; Kamyshnikov, O.Y.; Babakhin, A.A.; Zverev, V.V.; Johnston, S.L.; Khaitov, R.M. Small Interfering RNAs Targeted to Interleukin-4 and Respiratory Syncytial Virus Reduce Airway Inflammation in a Mouse Model of Virus-Induced Asthma Exacerbation. *Hum. Gene Ther.* **2014**, *25*, 642–650. [[CrossRef](#)]
45. Gürtler, C.; Bowie, A.G. Innate immune detection of microbial nucleic acids. *Trends Microbiol.* **2013**, *21*, 413–420. [[CrossRef](#)]
46. McCutcheon, K.M.; Jordan, R.; Mawhorter, M.E.; Noton, S.L.; Powers, J.G.; Fearn, R.; Cihlar, T.; Perron, M. The Interferon Type I/III Response to Respiratory Syncytial Virus Infection in Airway Epithelial Cells Can Be Attenuated or Amplified by Antiviral Treatment. *J. Virol.* **2016**, *90*, 1705–1717. [[CrossRef](#)]
47. Piedra, F.-A.; Mei, M.; Avadhanula, V.; Mehta, R.; Aideyan, L.; Garofalo, R.P. The interdependencies of viral load, the innate immune response, and clinical outcome in children presenting to the emergency department with respiratory syncytial virus-associated bronchiolitis. *PLoS ONE* **2017**, *12*, 0172953. [[CrossRef](#)]
48. Tan, L.; Coenjaerts, F.E.; Houspie, L.; Viveen, M.C.; Van Bleek, G.M.; Wiertz, E.J.; Martin, D.P.; Lemey, P. The Comparative Genomics of Human Respiratory Syncytial Virus Subgroups A and B: Genetic Variability and Molecular Evolutionary Dynamics. *J. Virol.* **2013**, *87*, 8213–8226. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).